

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

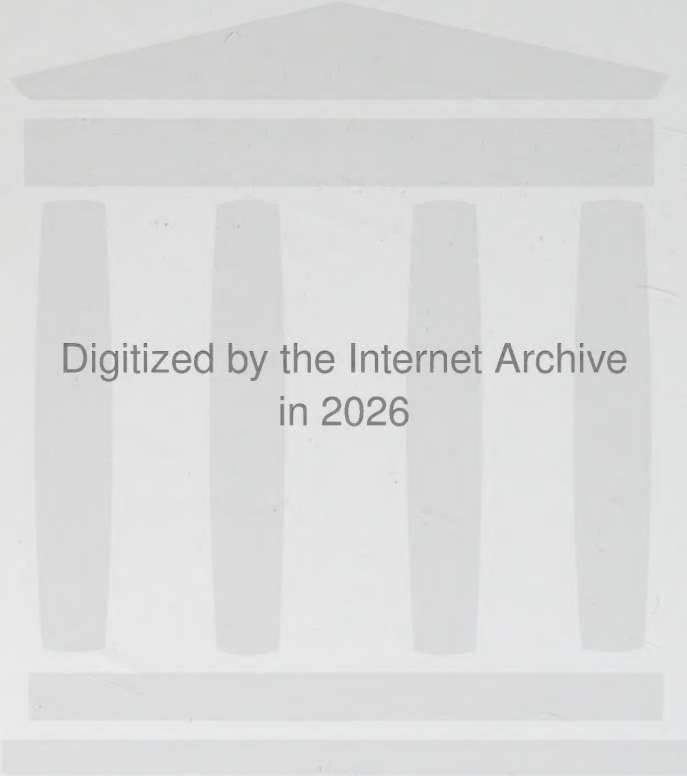
---

Studien zur Haftung und Ausbreitung von 4 Herpesvirus  
equi 1-Stämmen nach intraperitonealer Infektion  
des Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*)

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Wolfgang Miels  
Tierarzt aus Selb

Berlin 1972  
Journal-Nr. 791



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41550805\\_0026](https://archive.org/details/IA41550805_0026)

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

---

Studien zur Haftung und Ausbreitung von 4 Herpesvirus  
equi 1-Stämmen nach intraperitonealer Infektion  
des Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*)

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Wolfgang Mielsch  
Tierarzt aus Selb

Berlin 1972  
Journal-Nr. 791

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

|               |                        |
|---------------|------------------------|
| Vorsitzender: | Prof. Dr. H.-J. Sinell |
| Referent:     | Prof. Dr. H. Hartwigk  |
| Korreferent:  | Prof. Dr. G. Monreal   |



Tag der Promotion: 12.7.1972

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                    | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. Einleitung                                                                      | 5     |
| 2. Literatur                                                                       | 6     |
| 2.1. Allgemeines                                                                   | 6     |
| 2.2. Die Infektion des Goldhamsters mit dem<br>Herpesvirus equi 1                  | 7     |
| 2.3. Die Bedeutung der Makrophagen bei Virus-<br>infektionen                       | 9     |
| 2.4. Das virämische Stadium von virusbedingten<br>Erkrankungen                     | 13    |
| 2.5. Veränderungen des Blutbildes im Verlauf<br>von Viruserkrankungen              | 16    |
| 3. Eigene Untersuchungen                                                           | 17    |
| 3.1. Material und Methoden                                                         | 17    |
| 3.1.1. Virusstämme, Virusvermehrung und<br>Virustitration                          | 17    |
| 3.1.2. Tiermaterial                                                                | 19    |
| 3.1.3. Infektionsmodus, Gewinnung und Auf-<br>bereitung des Untersuchungsmaterials | 19    |
| 3.1.4. Versuche mit Peritonealmakrophagen                                          | 21    |
| 3.1.5. Immunfluoreszenz                                                            | 23    |
| 3.2. Ergebnisse                                                                    | 25    |
| 3.2.1. Untersuchung der Bauchhöhlen-<br>Spülflüssigkeit                            | 25    |
| 3.2.2. Untersuchung des Blutes                                                     | 26    |
| 3.2.3. Leukozytäre Blutbild                                                        | 28    |
| 3.2.4. Untersuchung der Leber mit Hilfe<br>der Immunfluoreszenz                    | 36    |
| 3.2.5. Versuche mit Peritonealmakrophagen                                          | 40    |
| 4. Diskussion                                                                      | 51    |
| 5. Zusammenfassung                                                                 | 59    |
| 6. Summary                                                                         | 60    |
| 7. Literaturverzeichnis                                                            | 61    |



## 1. EINLEITUNG

Die Rhinopneumonitis des Pferdes ist durch Aborte, respiratorische Katarrhe, Genitalexantheme und Störungen des Zentralnervensystems gekennzeichnet. Die Pathogenese dieser verschiedenen Krankheitsformen wirft viele Fragen auf, die am Pferd als Versuchstier nur schwer geklärt werden können.

Es ist erwiesen, daß sich zahlreiche Herpesvirus equi 1-Stämme im Hamster vermehren und auch eine schwere Erkrankung verursachen können. Damit ergeben sich Möglichkeiten, den Goldhamster als Modelltier zu verwenden und am Goldhamster über die Haftung und Ausbreitung verschiedener Herpesvirus equi 1-Stämme Studien durchzuführen. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, das Verhalten verschiedener pathogener Herpesvirus-Stämme des Pferdes nach Inokulation in die Bauchhöhle des Goldhamsters zu prüfen. Dabei sollte der Rolle der Lebermakrophagen bei der Infektionsabwehr und der Ausbreitung des Virus über die Blutbahn sowie den Veränderungen des leukozytären Blutbildes besonderes Interesse gewidmet werden.

## 2. LITERATUR

### 2.1. Allgemeines

Der Virusabort der Stuten wurde erstmals von DIMOCK und EDWARDS beschrieben (18, 19, 20). MANNINGER und CSONTOS (49) stellten den Zusammenhang zwischen dem Virusabort und der Influenza des Pferdes her, einer Erkrankung, die sich als Katarrh der oberen Luftwege manifestiert. Später erkannten DOLL und KINTNER (23) im Erreger des Virusabortes ein vom Influenzavirus unterscheidbares Virus, das primär ebenfalls eine respiratorische Affektion verursacht. Für diese Krankheit wurde der Name Rhinopneumonitis vorgeschlagen (26). Die Erkrankung kann auch unter Symptomen des Genitalexanthems oder zentralnervöser Störungen verlaufen (63, 69).

Von PLUMMER und WATERSON (64) wurde das Virus der Herpesvirusgruppe zugeordnet und als Herpesvirus equi 1 bezeichnet. Im Kreuzneutralisationstest lassen sich 2 Subtypen unterscheiden. Subtyp 1 entspricht dem Stamm Ky-D und Subtyp 2 dem Stamm RAC-H. In Deutschland wird vorwiegend der Subtyp 2 isoliert.

Nach überstandener respiratorischer Infektion zeigt sich beim Pferd eine humorale Immunität, die durch später erfolgende Infektionsschübe Steigerungen erfährt. Virusneutralisierende Antikörper im Blutserum tragender Stuten verhindern nicht unbedingt, daß es zu einer erneuten Infektion und einem Verfohlen kommt. Dabei fehlen in der Regel Symptome einer Erkrankung der oberen Luftwege (24). BRYANS (13) isolierte das Virus aus der Leukozytenfraktion experimentell infizierter Pferde, obwohl diese neutralisierende Antikörper im Blut besaßen. Der Autor folgerte aus seinen Versuchsergebnissen, daß das Virus in den Leukozyten durch die neutralisierenden Antikörper nicht inaktiviert wird. Eine Übertragung des Virus auf den Fetus durch virusenthaltende weiße Blutzellen wurde von BRYANS vermutet.

## 2.2. Die Infektion des Goldhamsters mit dem Herpesvirus equi 1

Von der Empfänglichkeit des Goldhamsters für eine Herpesvirus equi 1-Infektion berichteten erstmals ANDERSON und GOODPASTURE (1), nachdem sie in den Leberzellen neugeborener, infizierter Hamster Einschlußkörperchen festgestellt hatten. Sichtbare Krankheitserscheinungen fehlten bei den Hamstern.

DOLL und Mitarb. gelang es, Virusisolate aus respiratorisch erkrankten Pferden (22) sowie aus Organen abortierter Fohlen gewonnenes Virus (25) an Goldhamster zu adaptieren. Weder die intraperitoneale Inokulation der Virusisolate noch die Infektion mit Lungengewebs suspension abortierter Feten verursachte bei einem der 14 untersuchten Virusstämme bei 3 - 4 Tage alten Hamstern eine ernste Erkrankung.

Durch fortlaufende Passagen mit nach und nach älter werdenden Hamstern gelang es, bei 11 der Virusstämme die Pathogenität so zu steigern, daß die Infektion 3 - 4 Wochen alter Tiere nach der 30. - 35. Passage zu einer hohen Mortalität führte. Die optimale Vermehrung der Virusstämme im Hamsterorganismus schien nach der 50. Passage erreicht zu sein. 3 Virusstämme zeigten keine Pathogenität für den Goldhamster.

Unabhängig vom Infektionsweg (intraperitoneal, subkutan, intramuskulär, intranasal und intracerebral) äußerte sich die Erkrankung regelmäßig in einer Hepatitis, bei der es zu einer Bildung typischer, intranukleärer Einschlußkörperchen kam. Die intraperitoneale Inokulation erwies sich als am wirkungsvollsten, was erklärt, daß alle Autoren bei ihren späteren Studien diesen Infektionsmodus verwendeten. Das hamsteradaptierte Virus rief bei einer Infektionsdosis von  $10^4$  LD<sub>50</sub>/ml den Tod in der 18. - 24. Stunde p.i. hervor.

Mit dem zeitlichen Ablauf der morphologischen Veränderungen in der Leber bei Verwendung des Virusstammes Ky-A (80. Hamsterpassage) beschäftigten sich RANDALL und BRACKEN (65). Sie bedienten sich histologischer und biochemischer Methoden und stellten die Virustiter in Leber und Blut fest. In der 3. Stunde p.i. fanden sie erste Anzeichen einer Virusvermehrung in der aufgelockerten Struktur der Leberzellkerne. 6 Stunden p.i. traten die ersten Nekroseherde mit leukozytärer Infiltration auf. In den Leberzellen dieser Bezirke wiesen die Autoren die typischen Einschlusskörperchen nach. Die Mehrzahl der Leberzellen war nach der 9. Stunde p.i. infiziert. Ab der 15. Stunde p.i. schien jede Zelle in das Infektionsgeschehen einbezogen zu sein. Eine Virämie konnte ab der 3. Stunde p.i. des Krankheitsablaufes bis zum Tode festgestellt werden. Der Virustiter im Blut fiel von der 3. bis zur 6. Stunde p.i. ab, stieg in den folgenden Stunden wieder an, um in der 12. Stunde p.i. seinen höchsten Stand zu erreichen, der bis zum Tod des Tieres erhalten blieb. Der Virustiter in der Leber erhöhte sich ab der 3. Stunde p.i. bis zur 6. Stunde p.i., um bis zum Versuchsende nicht mehr abzufallen. Die Autoren erklärten den Anstieg des Bluttiters in der 6. Stunde p.i. mit dem zu diesem Zeitpunkt frei werdenden Virus aus den Leberzellen.

HOGGAN, METZGER und SMITH (37) führten als erste Untersuchungen über das Infektionsgeschehen in der Leber mit Hilfe der Immunfluoreszenz durch, wobei sie den verwendeten Virusstamm nicht näher bezeichneten. In der 1. Stunde p.i. wiesen sie das Virus "adjacent to the sinusoids" nach. In der 4. Stunde p.i. konnten sie kein Virus finden. Ab der 6. Stunde p.i. war das Virus in ansteigender Menge bis zum Versuchsende in der 20. Stunde p.i. nachweisbar.

In einer weiteren Studie mit fluoreszierenden Antikör-

pern bestätigten ISHIZAKI und SHIMIZU (39) den von RANDALL und BRACKEN (65) beschriebenen zeitlichen Ablauf der Infektion in der Leber. Wie letztere Autoren arbeiteten sie mit dem an den Goldhamster adaptierten Virusstamm Ky-D. Die erste spezifische Kernfluoreszenz trat in den Leberzellen nach 3 Stunden auf. Sie nahme bis zur 5. Stunde zu. In der 7. Stunde p.i. begann zusätzlich das Zytoplasma zu fluoreszieren. Die Fluoreszenz des Zytoplasmas blieb bis zum Tod in der 18. Stunde p.i. erhalten und zeigte sich bei einer zunehmenden Zahl von infizierten Zellen.

Studien über die Virusvermehrung (Ky-A Stamm, 355. Hamsterpassage) in der Leber mittels des Elektronenmikroskops, die ARHELGER, DARLINGTON und RANDALL (2) durchführten, stimmten im zeitlichen Infektionsverlauf mit den Angaben aller zu diesem Thema zitierten Autoren überein. Viruspartikel wurden von ARHELGER und Mitarb. in den Sinusoiden nicht nachgewiesen, jedoch enthielten die Sinusoide in der 5. Stunde p.i. zahlreiche Leukozyten und Erythrozyten.

### 2.3. Die Bedeutung der Makrophagen bei Virusinfektionen

Nachdem METCHNIKOFF (52) die Fähigkeit der Phagozytose bei den großen mononukleären Zellen, den Makrophagen, beschrieben hatte und ASCHOFF und KIYONO (3) das Zellsystem aller phagozytierenden Zellen eines Organismus als retikulo-endotheliales-System (RES) definiert hatten, wurde die Fähigkeit dieses Systems, Substanzen aus dem Blut zu eliminieren, eingehend erforscht (9, 12, 21, 40).

Für vorliegende Versuche ist das Verhalten der Makrophagen gegenüber infektiösem Virus von besonderem Interesse. BEARD und ROUS (8) untersuchten das Vaccinia-Virus in Kulturen von Kupffer'schen Sternzellen und Peritonealmakrophagen des Kaninchens. Wider Erwarten vernichte-

ten die Zellen das Virus nicht. Vielmehr nahm das Virus an Menge zu, wobei die Pathogenität für das Kaninchen nach intradermaler Injektion abnahm. BANG und WARWICK (5) stellten fest, daß das Mäusehepatitisvirus (MHV) die Makrophagen in Leber-, Milz- und Lungengewebekulturen selektiv zerstört. Erst nach mehreren Passagen in Lebergewebekulturen wurden schließlich auch die Parenchymzellen durch das Virus geschädigt. In weiteren Versuchen (6) fanden die Autoren, daß Makrophagenkulturen eines für die Infektion mit dem MHV empfänglichen Mäusestammes nach Zusatz von MHV degenerierten, während die gleichen Kulturen eines resistenten Mäusestammes nach der Infektion keine Veränderungen aufwiesen. Bei Kreuzungsversuchen mit den beiden Mäusestämmen ergab sich, daß die Ursache für die unterschiedliche Empfänglichkeit der Makrophagen genetisch verankert war. GOODMAN und KOPROWSKI (32) berichteten über ähnliche Ergebnisse. In Makrophagenkulturen von für Arbo B-Virus empfänglichen Mäusen vermehrte sich das Virus stark, während keine oder eine nur schwache Vermehrung in Makrophagenkulturen resistenter Mäuse beobachtet werden konnte.

Seit Einführung der Immunfluoreszenztechnik war ein wichtiges Hilfsmittel zur Beantwortung pathogenetischer Fragen gefunden. Man konnte nun infizierte Zellen sicher erkennen und ihre Art und Lokalisation im Organismus feststellen. Die Bedeutung der Immunfluoreszenz beim Studium des Infektionsgeschehens demonstrierten als erste LIU und COFFIN (16, 47) durch ihre Arbeiten über die Ausbreitung des Hundestaupavirus bei intranasal infizierten Frettchen und Hunden. Bei mit Ektromelie-Virus über den Respirationstrakt infizierten Mäusen bewies ROBERTS (66) weiterhin, daß Alveolarmakrophagen neben Mucosazellen die ersten infizierten Zellen im Atmungstrakt waren. Die überragende Bedeutung der Kupffer'schen Sternzellen in der Leber für die

Eliminierung von im Blut kreisenden, nicht an Blutzellen gebundenem Virus erhärteten MIMS (55) und ROBERTS (67) ebenfalls mittels der Immunfluoreszenz.

In einer Studie "Aspects of the pathogenesis of virus disease" faßte MIMS 1964 (58) alle bis zu diesem Zeitpunkt gesicherten Kenntnisse über die Rolle des RES während der frühen Phase einer Virusinfektion zusammen. Am Modell des Infektionsgeschehens in Mäuselebern zog er vier denkbare Möglichkeiten in Betracht, wie verschiedene Virusarten auf die Zellen des RES wirken. Er geht davon aus, daß ein hepatotropes Virus die Leber im Normalfall über den Blutweg erreicht. Da jedoch die empfänglichen Parenchymzellen durch eine Wand phagozytierender Zellen (Sinusendothelien und Kupffer'sche Sternzellen) vom Blutstrom getrennt sind, hängt die Haftung der Infektion und ihre Ausbreitung in den Leberzellen von dem Verhalten des Virus in den phagozytierenden Zellen der Sinusoidwand ab. Mit dem Elektronenmikroskop sichtbare Poren in der Sinusoidwand sind seiner Ansicht nach nicht für Viruspartikel passierbar.

Unter Verwendung der Ergebnisse eigener Untersuchungen und Untersuchungen anderer Autoren stellte MIMS die möglichen Reaktionsabläufe von Lebermakrophagen gegenüber Viruspartikeln zusammen. Er unterscheidet folgende Möglichkeiten:

a) Keine Virusaufnahme durch die Makrophagen

Dieser Fall trifft für das Poliovirus Typ 1 (58) zu. Die Infektion haftet nicht. Das im Blut kreisende Virus wird durch thermische Inaktivierung und durch im Blutplasma vorhandene viruzide Substanzen vernichtet.

b) Aufnahme und intrazellulärer Abbau von Viruspartikeln durch die Makrophagen

Die Viruspartikel werden von den Lebermakrophagen phagozytiert und abgebaut. Als Beispiel wird der CL-Stamm

des Vaccinia-Virus angeführt. Dieser Stamm ist bei intravenöser Inokulation für die Maus nicht pathogen. Wird die Maus jedoch über den Gallengang infiziert, erreicht das Virus die empfänglichen Leberzellen direkt und vermehrt sich in ihnen (58).

c) Aufnahme und passiver Transport von Viruspartikeln durch die Makrophagen

Werden Mäusen hohe Dosen von Influenza- (57) oder Rift valley Fieber-Virus (54) intravenös injiziert, sind nach 7 bzw. 1 Stunde p.i. infizierte Leberzellen nachzuweisen. Diese Zeitspanne ist zu kurz, um einen vorherigen Vermehrungszyklus in den Lebermakrophagen zu ermöglichen. Das Virus ist also von den Makrophagen aufgenommen worden und ohne Beeinträchtigung der Infektiosität auf der Seite der Parenchymzellen wieder ausgetreten. Da dieser Effekt nur mit hohen Virusdosen zu erzielen ist, äußerte MIMS die Vermutung, daß in diesem Fall die Makrophagen in ihrer Abwehrfunktion überfordert worden sind. Ähnliche Ergebnisse, die durch intravenöse Injektion großer Mengen kolloidalen Goldes (62) erzielt worden waren, stützten diese Theorie.

d) Vermehrung des Virus in den Makrophagen

Eine Vermehrung von Viruspartikeln konnte bei der Ektromelie-Infektion der Maus festgestellt werden. Nach intravenöser Injektion läßt sich das Ektromelie-Virus in den Sinusoidwandungen nachweisen, ist aber hier schon wieder nach einer halben Stunde verschwunden, da es sich in der Eklipsephase befindet. 7 Stunden p.i. ist es in den gleichen Zellen wieder zu finden. Gleichzeitig erhöht sich der Virustiter in der Leber. Erst nach diesem ersten Vermehrungszyklus in den Makrophagen werden die Leberzellen infiziert. Eine ähnliche Verhaltensweise wird für das Virus der infektiösen Hepatitis des Hundes (15) und das Gelbfiebertvirus im Affen vermutet (58).

Diese Ergebnisse von MIMS, die die Bedeutung der Makrophagen in der frühen Phase einer Virusinfektion kennzeichnen, wurden durch Arbeiten von JOHNSON (41) und ZISMAN (81) bestätigt. JOHNSON wies eine Beteiligung der Kupffer'schen Sternzellen bei der Herpesvirus simplex-Infektion der Maus nach, während es ZISMAN gelang, erwachsene, normalerweise resistente Mäuse für eine Infektion mit dem Herpesvirus simplex empfänglich zu machen. Dies war dadurch möglich, daß er vor der Infektion die Tiere mit Antimakrophagenserum behandelte.

#### 2.4. Das virämische Stadium von virusbedingten Erkrankungen

Bei den meisten Viruserkrankungen, die nach einer Vermehrungsphase an der Eintrittsstelle in den Organismus entfernte Organe ins Infektionsgeschehen einbeziehen, muß eine Verbreitung des Virus über die Blut- bzw. Lymphbahn angenommen werden. Grundsätzlich sind zwei Arten der Virämie zu unterscheiden: Das Virus kann sich frei im Blutplasma befinden oder an die Zellbestandteile des Blutes gebunden sein.

Befindet sich Virus frei im Plasma, wird es meistens sehr schnell durch die Zellen des RES, hauptsächlich der Lebermakrophagen aus der Blutbahn entfernt. Diese schnelle Eliminierung bedingt, daß bei Virusinfektionen, bei denen das Virus nur langsam oder in kleinen Mengen ins Blutplasma eingeschleust wird, oft keine Virämie nachzuweisen ist (58).

An die zelligen Bestandteile des Blutes gebundenes Virus ist der Phagozytose durch die Lebermakrophagen entzogen. Die Dauer einer derartigen Virämie wird durch das Auftreten humoraler Antikörper und durch die Lebensdauer der Blutzellen begrenzt (58, 71).

Bei der Infektion der Maus mit dem Rift valley Fieber- und dem Influenza-Virus ist im Stadium der Virämie die Adsorption des Virus an die Erythrozyten belegt (53, 34).

Die größte Bedeutung dürfte die Bindung des Virus an die weißen Blutzellen haben. Bei der Rinderpest wurde das erste Mal die Bindung des Virus an die Leukozyten beschrieben (76). Seitdem ist diese Bindung auch für weitere Viruserkrankungen festgestellt worden. GRESSER und LANG (33) haben in ihrer 1966 erschienenen Übersichtsarbeit "Relationship between viruses and leukocytes" alle, bis zu diesem Zeitpunkt bekannten, Virusinfektionen, bei denen die Virämie durch die Bindung des Virus an die weißen Blutzellen charakterisiert ist, beschrieben.

Mittels der Immunfluoreszenz wiesen LIU und COFFIN (16, 47) als erste Staupevirus in Lymphozyten und Monozyten des peripheren Blutes von experimentell infizierten Hunden und Frettchen nach. Mit derselben Methode entdeckten auch KOVACS (46), BARATAWIDJAJA (7) und BENDA (10) Polio-, Vaccinia-, Tollwut- und Choriomeningitis-Virus in den Blutleukozyten von infizierten Versuchstieren. SOMMERVILLE (72) fand hauptsächlich in polymorphkernigen Granulozyten, aber auch in Monozyten, die er aus dem Blut frisch erkrankter Menschen gewonnen hatte, Coxsackie B-, Masern-, Mumps-, Influenza-, Herpes zoster- und Vaccinia-Virus. Er schlug die Leukozytenuntersuchung mittels der Immunfluoreszenz als eine Methode für eine Frühdiagnose der genannten Viruserkrankungen vor. Beim Auftreten von Antikörpern erlosch die Nachweisbarkeit von Virusantigen in den Granulozyten. Dagegen isolierte BRYANS (13) infektiöses Herpesvirus equi 1 aus der Leukozytenfraktion von Pferden, die neutralisierende Antikörper im Blutserum besaßen. Auch andere equine Herpesviren sind bei Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern gefunden worden (44, 59). Die Autoren machten jedoch keine Angaben, welche Zellen der Leukozyten das Virus enthielten. Aus derartigen Angaben wäre möglicherweise der Widerspruch zu den Ergebnissen von SOMMERVILLE (72) zu klären gewesen.

MIMS (58) ist nicht der Auffassung, daß die polymorphkernigen Granulozyten in der Lage sind, eine länger währende Virämie zu unterhalten, da die Granulozyten nur eine kurze Lebensdauer besitzen. Nach dem Absterben der Granulozyten wird ein etwaiger Antigengehalt durch humorale Antikörper inaktiviert, und die Zellreste werden von den Makrophagen aufgenommen. In den langlebigen Lymphozyten und Monozyten sieht MIMS diejenigen Zellen, in denen das infektiöse Virus über längere Zeit im Blut zirkuliert. Geschützt vor Inaktivierung kann das Virus bei den extravasalen Wanderungen dieser Zellen in empfängliche Gewebe gelangen. EDELMAN und WHEELLOCK (27, 78, 79) stützten diese Theorie mit ihren Studien über Viren in reinen Kulturen von polymorphkernigen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten des Menschen. Eine Persistenz oder Vermehrung von Stomatitis vesicularis-, Newcastle disease- und Gelbfieber-Virus fanden sie nur in Monozyten oder in mit Phythämagglutinin stimulierten Lymphozytenkulturen.

Bei Untersuchungen über das Verhalten von Viren der Herpesgruppe in Leukozytenkulturen und während der Virämiephase sind weiterhin folgende Studien beschrieben:

GARABEDIAN und SYVERTON (30) berichteten, daß das Herpesvirus simplex in Peritonealzellkulturen des Kaninchens bevorzugt an die Makrophagen gebunden war und dabei nur wenig an Infektiosität verlor. Wiederholt ist die Vermehrung von Viren der Herpesgruppe in Leukozytenkulturen, die mit Phythämagglutinin stimuliert worden waren, gelungen (31, 60, 74). SOMMERVILLE (72) wies die Aufnahme von Herpesvirus simplex durch Peritonealzellen der Maus in vitro mittels der Immunfluoreszenz nach. Das gleiche gelang JOHNSON (42) mit gleicher Technik in vivo. JOHNSON fand das Virus während der Virämie vorwiegend frei im Blutplasma. Nur ein ganz geringer Teil des Virus war an die zelligen Bestandteile des Blutes gebun-

den. wobei Erythrozyten und Leukozyten nicht getrennt untersucht wurden.

## 2.5. Veränderungen des Blutbildes im Verlauf von Viruserkrankungen

Veränderungen des Blutbildes beim Goldhamster wurden nach Infektion mit onkogenen Viren beschrieben. Für andere Viruserkrankungen liegen jedoch meines Wissens Berichte über solche Veränderungen nicht vor.

Allgemein gilt, daß Virusinfektionen, die ohne bakterielle Sekundärinfektionen verlaufen, durch eine mehr oder minder starke Leukopenie in der Anfangsphase gekennzeichnet sind. Nach Abklingen der Vermehrungsphase des Virus erfolgt eine Normalisierung des Blutbildes, wobei sich manchmal der Anteil der Monozyten an der Leukozytenzahl erhöht. Bei bakterieller Sekundärinfektion oder bei Viruserkrankungen, die zu ausgedehnten Gewebsschädigungen führen, wie z.B. die infektiöse Hepatitis des Menschen, folgt der Leukopenie eine Leukozytose mit einer Linksverschiebung der neutrophilen Granulozyten (33, 35).

### 3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1. Material und Methoden

##### 3.1.1. Virusstämme, Virusvermehrung und Virustitration

###### Virusstämme:

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mit 4 Herpesvirus equi 1-Stämmen durchgeführt. Die Virusstämme tragen die Bezeichnung P-1, P-15, RAC-H und Prevaccinol. Die Stämme P-1 und P-15 sind aus dem Respirationstrakt erkrankter, erwachsener Pferde isoliert worden (80), während der Stamm RAC-H aus einem abortierten Fohlen angezüchtet werden konnte (50). Bei dem Prevaccinol-Virusstamm handelt es sich um einen Lebendimpfstoff der Behringwerke\* gegen den Virusabort der Stuten. Er stellt eine an Ferkelnieren-Zellkulturen attenuierte Passage des RAC-H-Stammes dar (51). Die verwendeten Virusstämme sind im einfachen Kreuzneutralisationstest untereinander nahezu identisch und lassen sich dem Serotyp 2 des Herpesvirus equi 1 zuordnen (50).

Im einzelnen waren die Stämme wie folgt charakterisiert:

|                          |                                                                                                                                             |                                  |                   |                                       |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| P-1                      | 24.                                                                                                                                         | Schweinenieren-Zellkulturpassage | $3,5 \times 10^3$ | plaquebildende Einheiten (PBE)/1,0 ml |
| P-15                     | 12.                                                                                                                                         | "                                | $3 \times 10^4$   | PBE/1,0 ml                            |
| RAC-H                    | 21.                                                                                                                                         | "                                | $4 \times 10^4$   | PBE/1,0 ml                            |
| Prevaccinol (Op.-Nr. 23) | Die Charge besaß nach Fertigstellung laut Mitteilung der Behringwerke einen Infektiositätstiter von $10^{7,324}$ KID <sub>50</sub> /1,0 ml. |                                  |                   |                                       |

Alle 4 Virusstämme zeigten eine befriedigende Vermehrung in primären Schweinenieren-Zellkulturen. Hingegen war das Verhalten der Virusstämme im Hamster unterschiedlich. Während der RAC-H-Virusstamm in der verabreichten Dosis

\*Für die Überlassung des Impfstoffs Prevaccinol<sup>®</sup> bedanke ich mich bei den Behringwerken Marburg.

meist zum Tod des Hamsters führte, blieben die Tiere nach Infektion mit den Virusstämmen P-1, P-15 und Prevaccinol am Leben (51, 80).

#### Virusvermehrung in Zellkulturen:

Die primären Schweinenieren-Zellkulturen dienten als Zellsystem sowohl für die Herstellung der Viruschargen, als auch für die Virustitration. Die Schweinenieren-Zellkulturen sind nach dem üblichen Trypsinierungsverfahren von DULBECCO, VOGT und YOUNGER hergestellt worden. Die Züchtung erfolgte, je nach Verwendungszweck, in Roux-Flaschen oder in Plastikpetrischalen ( $\varnothing$  5 cm). Als Anzuchtmedium wurde Earle'sche Salzlösung (80 %) mit Zusatz von 10 % Kälberserum, 10 % einer 5 %igen Lactalbumin-Lösung, Phenolrot und Antibiotika (100 I.E. Penicillin u. 100 I.E. Streptomycin/1,0 ml) verwendet. Als Erhaltungsmedium diente L-15-Medium der Firma FLOW LABORATORIES GLASGOW. Für die Herstellung von Viruspools der einzelnen Stämme wurde ausschließlich das L 15-Medium mit Antibiotikazusatz ohne die anderen erwähnten Zusätze verwendet. Zur Durchführung des Plaque-Testes erhielt dieses Medium zusätzlich 2 % Kälberserum und 2 % Sephadex-Gel Typ G 200 nach der Methode von SCHWÖBEL (70).

#### Virustitration:

Blutplasma, Leukozyten und Erythrozyten von Goldhamstern, die auf den Gehalt von infektiösem Virus untersucht werden sollten, sind im Plaque-Test austitriert worden. Auf 3 Plaque-Schälchen wurden je 0,1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufe des Untersuchungsmaterials pipettiert. Nach einer Adsorptionszeit von 90 min bei 37° C folgten das Waschen der Kultur und das Aufgeben des Überschüttungsmediums. Nach einer 3-tägigen Bebrütung wurde der Zellrasen mit Formalin fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt. Die Auswertung der ermittelten plaquebildenden Einheiten (PBE) erfolgte nach Formeln und Tabellen, die in einer Veröffentlichung von LORENZ (48) enthalten sind.

### 3.1.2. Tiermaterial

6 bis 8 Wochen alte, männliche und weibliche, konventionell gehaltene Goldhamster aus institutseigener Zucht dienten für alle Tierversuche. Ihr Durchschnittsgewicht betrug 50 - 60 g.

### 3.1.3. Infektionsmodus, Gewinnung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

#### Infektionsmodus:

48 Goldhamster erhielten 0,5 ml der jeweiligen Virussuspension intraperitoneal injiziert. Je 3 Hamster wurden nach der Infektion in folgenden Zeitabständen getötet: 15 min, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 72 und 96 Stunden.

#### Gewinnung und Aufbereitung des Blutes:

In Äthernarkose wurden den Hamstern die Blutgefäße der Achselhöhle mit einem Scherenschnitt eröffnet, um das Blut mit einer heparinisierten Pipette aufzunehmen. Das Blut von 3 Tieren wurde zusammengefaßt.

Zur Plasmagewinnung wurde die Hälfte des Blutes 10 min bei 2500 U/min zentrifugiert. Die andere Hälfte diente zur Trennung der Leukozyten von den Erythrozyten. In Abwandlung der Methode von GALTON und HOLT (29) wurde ein Teil des heparinisierten Blutes mit der gleichen Menge Plasmaexpander ("neo-PLASMAGEL<sup>®</sup>", Infusionslösung zur intravenösen Anwendung der Firma B. BRAUN MELSUNGEN) in einem Reagenzröhrchen gemischt und senkrecht aufgestellt. Bei Zimmertemperatur senkten sich die Erythrozyten in 20 min bis zur Hälfte der Flüssigkeitssäule ab. Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und enthielt neben wenig Erythrozyten hauptsächlich die weißen Blutzellen in etwa der halben Konzentration, wie sie im Normalblut vorliegen. Durch Abzentrifugieren und Resuspendieren des Zellrückstandes mit wenig PBS (phosphat-

gepufferter Salzlösung) wurde eine Anreicherung der Leukozyten erzielt. Von den gewonnenen Leukozyten wurde ein Objektträgerausstrich für die Immunfluoreszenz angefertigt, und der Rest nach thermischer Beugung im Plaque-Test auf Virusgehalt untersucht. Die Erythrozyten erfuhren die gleiche Behandlung.

Die Bestimmung der Leukozytenzahl eines jeden Tieres erfolgte nach dem üblichen Auszählverfahren in einer BÜRKER-TÜRK-Zählkammer. Von jedem Tier sind Blutaussstriche nach PAPPENHEIM gefärbt worden, um die Leukozyten zu differenzieren. Der Auswertung der Blutzelluntersuchungen lag eine Tabelle von HOUSE und Mitarb. (38) zugrunde. Darin sind die Standardabweichungen aller Blutzellwerte für in verschiedenen Altersgruppen zusammengefaßte Goldhamster verzeichnet.

Zur Feststellung der Blut-Clearance-Werte für die verschiedenen Virusstämme erfolgte in weiteren Versuchen die intravenöse Inokulation der Virussuspensionen. Dazu wurden die Hamster mit Nembutal (1,7 mg/100 g Körpergewicht i.p.) narkotisiert, die Vena jugularis durch einen 1 cm langen Hautschnitt freigelegt, 1 ml der Virussuspension intravenös appliziert und anschließend der Hautschnitt mit 2 Knopfleften geschlossen. Das Blut wurde nach 2, 10, 30 und 60 min, wie oben beschrieben, gewonnen und das Plasma auf Plaque-Schälchen verimpft.

#### Bauchhöhlenspülung und Gewinnung von Peritonealzellen:

Die Bauchhöhle wurde nach der Tötung bis einschließlich der 6. Stunde p.i. mit 3 ml heparinisiertem PBS (6 E Heparin/1,0 ml PBS) gespült. Die Spülflüssigkeit wurde aufgefangen, geteilt und die eine Hälfte thermisch getaucht, um darin enthaltene Peritonealzellen aufzuschließen. Dieser Teil wurde im Plaque-Test auf seinen Gehalt an infektiösen Viruspartikeln geprüft. Aus dem anderen Teil der Spülflüssigkeit wurden die Peritonealzellen durch Zentrifugation gewonnen, auf einen Objektträger

### 3.1.2. Tiermaterial

6 bis 8 Wochen alte, männliche und weibliche, konventionell gehaltene Goldhamster aus institutseigener Zucht dienten für alle Tierversuche. Ihr Durchschnittsgewicht betrug 50 - 60 g.

### 3.1.3. Infektionsmodus, Gewinnung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

#### Infektionsmodus:

48 Goldhamster erhielten 0,5 ml der jeweiligen Virussuspension intraperitoneal injiziert. Je 3 Hamster wurden nach der Infektion in folgenden Zeitabständen getötet: 15 min, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 72 und 96 Stunden.

#### Gewinnung und Aufbereitung des Blutes:

In Äthernarkose wurden den Hamstern die Blutgefäße der Achselhöhle mit einem Scherenschnitt eröffnet, um das Blut mit einer heparinisierten Pipette aufzunehmen. Das Blut von 3 Tieren wurde zusammengefaßt.

Zur Plasmagewinnung wurde die Hälfte des Blutes 10 min bei 2500 U/min zentrifugiert. Die andere Hälfte diente zur Trennung der Leukozyten von den Erythrozyten. In Abwandlung der Methode von GALTON und HOLT (29) wurde ein Teil des heparinisierten Blutes mit der gleichen Menge Plasmaexpander ("neo-PLASMAGEL"<sup>®</sup>, Infusionslösung zur intravenösen Anwendung der Firma B. BRAUN MELSUNGEN) in einem Reagenzröhrchen gemischt und senkrecht aufgestellt. Bei Zimmertemperatur senkten sich die Erythrozyten in 20 min bis zur Hälfte der Flüssigkeitssäule ab. Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig abgezogen und enthielt neben wenig Erythrozyten hauptsächlich die weißen Blutzellen in etwa der halben Konzentration, wie sie im Normalblut vorliegen. Durch Abzentrifugieren und Resuspendieren des Zellrückstandes mit wenig PBS (phosphat-

gepufferter Salzlösung) wurde eine Anreicherung der Leukozyten erzielt. Von den gewonnenen Leukozyten wurde ein Objektträgerausstrich für die Immunfluoreszenz angefertigt, und der Rest nach thermischer Beugung im Plaque-Test auf Virusgehalt untersucht. Die Erythrozyten erfuhren die gleiche Behandlung.

Die Bestimmung der Leukozytenzahl eines jeden Tieres erfolgte nach dem üblichen Auszählverfahren in einer BÜRKER-TÜRK-Zählkammer. Von jedem Tier sind Blutausstriche nach PAPPENHEIM gefärbt worden, um die Leukozyten zu differenzieren. Der Auswertung der Blutzelluntersuchungen lag eine Tabelle von HOUSE und Mitarb. (38) zugrunde. Darin sind die Standardabweichungen aller Blutzellwerte für in verschiedenen Altersgruppen zusammengefaßte Goldhamster verzeichnet.

Zur Feststellung der Blut-Clearance-Werte für die verschiedenen Virusstämme erfolgte in weiteren Versuchen die intravenöse Inokulation der Virussuspensionen. Dazu wurden die Hamster mit Nembutal (1,7 mg/100 g Körpergewicht i.p.) narkotisiert, die Vena jugularis durch einen 1 cm langen Hautschnitt freigelegt, 1 ml der Virussuspension intravenös appliziert und anschließend der Hautschnitt mit 2 Knopfheften geschlossen. Das Blut wurde nach 2, 10, 30 und 60 min, wie oben beschrieben, gewonnen und das Plasma auf Plaque-Schälchen verimpft.

#### Bauchhöhlenspülung und Gewinnung von Peritonealzellen:

Die Bauchhöhle wurde nach der Tötung bis einschließlich der 6. Stunde p.i. mit 3 ml heparinisiertem PBS (6 E Heparin/1,0 ml PBS) gespült. Die Spülflüssigkeit wurde aufgefangen, geteilt und die eine Hälfte thermisch beugt, um darin enthaltene Peritonealzellen aufzuschließen. Dieser Teil wurde im Plaque-Test auf seinen Gehalt an infektiösen Viruspartikeln geprüft. Aus dem anderen Teil der Spülflüssigkeit wurden die Peritonealzellen durch Zentrifugation gewonnen, auf einen Objektträger

ausgestrichen und mittels der Immunfluoreszenz untersucht.

#### Aufbereitung der Leber:

Die Entnahme der Leber folgte unmittelbar der Entblutung. Das Organ wurde in Blöckchen (Kantenlänge ca. 0,5 x 0,5 x 1 cm) zerteilt und diese in  $-80^{\circ}\text{C}$  vorgekühltem Isopentan eingefroren. Bei dieser Temperatur verblieben die Blöckchen bis zur Anfertigung von Kryostatschnitten in dieser Flüssigkeit.

#### 3.1.4. Versuche mit Peritonealmakrophagen

##### Gewinnung und Kultivierung:

Die Methode von BUSCHMANN und SCHÖNERT (14) zur Gewinnung von Mäuse-Peritonealmakrophagen galt als Arbeitsvorlage. Die Hamster erhielten 3 ml PBS mit Zusatz von 4 % Gelatine in die Bauchhöhle injiziert. Nach 48 Stunden wurden die Tiere in Äthernarkose getötet. In Abweichung von der zitierten Arbeit dienten 7 ml heparinisiertes PBS (6 E Heparin/1,0 ml) als Bauchhöhlen-Spülflüssigkeit. Die aus mehreren Hamstern gewonnene Spülflüssigkeit wurde in einem silikonisierten, im Eisbad gekühlten Glasgefäß gesammelt. Nach Bestimmung der Zellzahl in der BÜRKER-TÜRK-Zählkammer ließen sich die Peritonealzellen durch Zentrifugation (10 min bei 800 U/min) gewinnen. Das Zellsediment wurde in L 15-Medium mit 20 % Kälberserum und Antibiotikazusatz so resuspendiert, daß eine Konzentration von  $6 \times 10^6$  Zellen/1,0 ml vorlag. Je 1,5 ml dieser Suspension wurden in schräg gelagerte Reagenzröhrchen gefüllt. Im Verlauf einer Stunde hatte sich der größte Teil der Zellen an der Glaswand festgesetzt. Die nicht an der Glaswand haftenden Erythrozyten, Lymphozyten und Granulozyten, also die Zellen, die die Fähigkeit des Anhaftens nicht in so ausgeprägtem Maß besitzen wie die Makrophagen, wurden nach 1 Stunde durch Mediumwechsel entfernt. Nach 18-stündigem Rollen bei  $37^{\circ}\text{C}$  erfolgte

ein weiterer Mediumwechsel, durch den die restlichen losen Zellen abgespült wurden.

Die mikroskopische Untersuchung infizierter und uninfizierter Makrophagen sowie die Prüfung ihrer Phagozytoseaktivität geschah mittels Folienkulturen nach KÖHLER und APODACA (45). Dazu wurden Streifen von Zellophanfolie in der Weise in Reagenzröhrchen eingelegt, daß sie der Glaswand rundum eng anlagen. Die Handhabung der Zellen in diesen Röhrchen entsprach der beschriebenen Makrophagenkultivierung.

#### Prüfung auf Phagozytoseaktivität:

Die Anzahl phagozytischer Zellen in einer Peritonealzellkultur gilt als Ausdruck ihres Gehalts an Makrophagen. Daher wurden die Zellkulturen nach dem 2. Mediumwechsel einem Phagozytostest unterzogen. Nach Zugabe von 0,1 ml einer 1:1000 in PBS verdünnten BACTO-LATEX 0,8l Suspension (DIFCO LABORATORIES DETROIT) in das Zellmedium hatten eine Stunde später 95 - 100 % der Zellen Latexpartikel aufgenommen.

#### Infektionsmodus der Makrophagenkulturen:

Abgegossene Makrophagenkulturen inkubierten mit 0,4 ml der 4 Virusstämme (Stamm RAC-H und Stamm Prevacinol in der Verdünnung 1:10) 9 Stunden lang bei 37° C im Röhrchenroller. Danach wurden sie mit Medium auf 2 ml aufgefüllt, um so den Nährstoffbedarf der Zellen für den 24- und den 48-Stundenwert sicherzustellen.

#### Prüfung der Virusaufnahme durch Makrophagen:

Bei Versuchsbeginn sowie nach 3, 6, 9, 24 und 48 Stunden wurde der Überstand von je 2 infizierten Röhrchen im Plaque-Test auf den Virusgehalt untersucht. Die Röhrchen des Ausgangswertes, der 3. und 6. Stunde mußten vor dem Abgießen ebenfalls auf 2 ml mit Zellmedium aufgefüllt werden, damit die Werte mit dem 24- und 48-Stunden-Versuch vergleichbar waren. Mehrmaliges Waschen

mit je 15 ml PBS sollte bei den verbliebenen Makrophagen an der Oberfläche haftendes Virus entfernen. Anschließend wurden die Zellen nach Zufügung von 1,0 ml PBS thermisch aufgeschlossen und ihr Gehalt an infektiösem Virus bestimmt.

#### Verhalten der Virusstämme in den Makrophagen:

Nach der Inkubationszeit und dem Abgießen der Virussuspension wurden die Makrophagen wie beschrieben gewaschen und die Röhrchen mit 2 ml Kulturmedium beschickt. Die Prüfung des Überstandes und der Zellen auf Virusgehalt erfolgte nach 9, 24 und 48 Stunden in der oben erläuterten Weise.

Bei allen Versuchen mit infizierten Makrophagen liefen als Kontrolle Röhrchen ohne Zellen, aber mit virushaltigem Medium parallel, um die Wärmeinaktivierung des Virus über die Zeitdauer des Versuches zu erfassen.

#### Mikroskopische Untersuchung der Makrophagen:

Folienkulturen infizierter und uninfizierter Makrophagen wurden mit Giemsa-Lösung gefärbt und mit dem Lichtmikroskop untersucht.

### 3.1.5. Immunfluoreszenz

Die Färbung der Leber-Kryostatschnitte (Dicke 5  $\mu$ ) und der Zellausstriche erfolgte nach der direkten Methode (17). Bei der Koppelung des Serums eines gegen den Virusstamm RAC-H immunisierten Schweines und von Schweinenormalserum mit Fluorescein-iso-thiocyanat wurde nach Angaben von VOSS und Mitarb. (77) vorgegangen. Durch mehrmaliges Adsorbieren des Konjugats an Hamsterleber- und Schweinenierenpulver konnte die unspezifische Fluoreszenz unterdrückt werden. Die Azetonfixierung der Zellausstriche und der Leberschnitte bei  $-20^{\circ}$  C dauerte 30 min, während das Konjugat in der feuchten Kammer 60 min lang bei  $37^{\circ}$  C auf die Präparate einwirkte. Die gefärbten Präparate

wurden in PBS-gepuffertes Glyzerin eingebettet.

Ein Fluoreszenzmikroskop der Firma ZEISS, das eine CSI-Lampe als Beleuchtungsquelle und ein Erregerfilter KP 500 besaß, diente zur Auswertung.

Um die Spezifität der beobachteten Fluoreszenz zu sichern, sind folgende Kontrollen durchgeführt worden:

#### 1. Kontrollgruppe:

Mit den 4 Virusstämmen infizierte Schweinenieren-Zellkulturen sowie eine uninfizierte Kultur wurden mit dem konjugierten Immuns serum gefärbt.

Analog dazu erfolgte die Färbung von Leberschnitten eines an einer RAC-H-Infektion gestorbenen Hamsters sowie von Leberschnitten eines nicht infizierten Tieres.

#### 2. Kontrollgruppe:

Die gleichen Zellkulturen und die gleichen Leberpräparate wie im 1. Kontrollversuch wurden mit konjugiertem Normalserum gefärbt.

### 3.2. Ergebnisse

#### 3.2.1. Untersuchung der Bauchhöhlen-Spülflüssigkeit

Um zu erfahren, wie lange infektiöses Virus in der Bauchhöhle verbleibt, wurde Bauchhöhlen-Spülflüssigkeit in bestimmten Zeitabständen auf die Menge des noch vorhandenen Virus untersucht.

| Virus-<br>stamm  | Zeit in Stunden p.i. |      |       |     |     |    |
|------------------|----------------------|------|-------|-----|-----|----|
|                  | 0,5                  | 1    | 2     | 3   | 4   | 6  |
| RAC-H            | 481                  | 205  | 50    | 11  | 2   | -  |
| Prevac-<br>cinol | 9000                 | 5100 | n.u.* | 600 | 400 | 45 |
| P-15             | 325                  | 1300 | 120   | 3   | -   | -  |
| P-1              | 7                    | -    | -     | -   | -   | -  |

Tab. 1: Virusnachweis in der Bauchhöhlen-Spülflüssigkeit in zunehmendem Zeitabstand p.i.  
Angaben in PBE/1,0 ml

\*n.u. = nicht untersucht

Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, nahm die Virusmenge der Spülflüssigkeit bei den Stämmen RAC-H, Prevaccinol und P-1 kontinuierlich ab. Die Zeitdauer bis zum völligen Verschwinden aus der Bauchhöhle war von der inokulierten Menge infektiöser Viruspartikel abhängig, denn der niedertitrige Stamm P-1 war schon nach einer Stunde nicht mehr nachzuweisen, während beim hochtitrigen Stamm Prevaccinol noch nach 6 Stunden geringe Mengen Virus gefunden wurden.

Auffällig ist, daß beim Stamm P-15 die plaquebildenden Einheiten in der 1. Stunde zugenommen hatten und dann erst abfielen. Die Versuche und Titrationsen wurden zweimal wiederholt, ohne daß das Ergebnis sich änderte.

Ergänzend sei bemerkt, daß bei allen 4 Stämmen in der 3. Stunde p.i. Peritonealzellen mit der Immunfluoreszenz untersucht wurden. Neben unspezifisch leuchtenden polymorphkernigen Granulozyten konnten bei den Stämmen RAC-H, Prevaccinol und P-1 Makrophagen mit spezifischer Fluoreszenz im Zytoplasma beobachtet werden. Hingegen konnte beim Virusstamm P-15 kein Virusantigen in den Zellen nachgewiesen werden.

### 3.2.2. Untersuchung des Blutes

Ziel der Untersuchungen war, festzustellen

1. wie lange das Virus nach i.p. Injektion im Blut in infektiöser Form verbleibt (primäre Virämie)
2. ob das Virus nach einer möglichen Vermehrung im Organismus wieder im Blut auftritt und an welche Blutbestandteile es gebunden ist (sekundäre Virämie).

Plasma, Erythrozyten und Leukozyten wurden getrennt untersucht. Ergänzend wurden die Blutzellen noch mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt.

Bei den Virusstämmen RAC-H, Prevaccinol und P-15 war infektiöses Virus nach 30 min im Blutplasma nachzuweisen. Aus Tabelle 2 geht hervor, daß die primäre Virämie beim Virusstamm RAC-H bis 3, beim Prevaccinol-Stamm bis 6 Stunden und beim Virusstamm P-15 bis 1 Stunde p.i. dauerte. Die Zeitspanne, in der sich infektiöses Virus im Blut befand, korrelierte mit der in die Bauchhöhle injizierten Virusmenge der genannten 3 Virusstämme.

Eine sekundäre Virämie war allein beim Virusstamm RAC-H zu finden. Ab der 12. Stunde p.i. lag bei diesem Virusstamm wieder eine "Plasma-Virämie" vor, die in der 30. Stunde p.i. ihren Höhepunkt erreicht. Eine geringe Menge von infektiösem Virus, die 0,7 % des Bluttiters nie überschritt, wurde bei der Titration der thermisch gebeugten Blutzellen bei diesem Stamm nachgewiesen.

Bei der Durchmusterung der Blutzellausstriche unter dem

| virus-<br>stamm | Zeit in Stunden p.i. |     |    |    |   |   |    |                   |                   |    |                   |                   |                   |  |
|-----------------|----------------------|-----|----|----|---|---|----|-------------------|-------------------|----|-------------------|-------------------|-------------------|--|
|                 | 0,5                  | 1   | 2  | 3  | 4 | 6 | 12 | 18                | 24                | 30 | 36                | 42                | 48                |  |
| AC-H            | 10                   | 5   | 18 | 10 | - | - | 30 | 5x10 <sup>4</sup> | 5x10 <sup>5</sup> | *  | 1x10 <sup>6</sup> | 1x10 <sup>6</sup> | 5x10 <sup>4</sup> |  |
| revac-<br>inol  | 17                   | 117 | 17 | ** | 7 | 3 | -  | -                 | -                 | -  | -                 | -                 | -                 |  |
| P-15            | 10                   | 3   | -  | -  | - | - | -  | -                 | -                 | -  | -                 | -                 | -                 |  |
| P-1             | -                    | -   | -  | -  | - | - | -  | -                 | -                 | -  | -                 | -                 | -                 |  |

Lab. 2: Virusnachweis im Blutplasma von Goldhamstern in zunehmenden Zeitabständen nach Infektion der Bauchhöhle mit den Herpesvirus equi 1-Stämmen RAC-H, Prevaccinol, P-15 und P-1. Infektionsdosis 0,5 ml Virussuspension. Angaben in PBE/1,0 ml

\* nicht ausstritt

\*\* nicht untersucht

Fluoreszenzmikroskop konnte zu jedem Zeitpunkt nur unspezifische Fluoreszenz festgestellt werden.

Für den Virusstamm P-1 wurde wahrscheinlich auf Grund der geringen Infektionsdosis zu keinem Zeitpunkt eine virämische Phase nachgewiesen.

Virämien werden oft nicht erkannt, wenn das Virus langsam und in kleinen Mengen in den Blutkreislauf eingeschleust wird und seine Eliminationsrate aus dem Blut gleichzeitig sehr hoch ist. Um zu prüfen, ob dieser Fall für das Fehlen einer Virämie beim Stamm P-1 verantwortlich gemacht werden konnte, wurde die Eliminationsgeschwindigkeit für die 4 Herpesvirus equi 1-Stämme nach intravenöser Inokulation von 1,0 ml Virussuspension bestimmt.

Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die Elimination sehr rasch erfolgte. Nach 30 min p.i. konnte keiner der 4 Virusstämme mehr im Blut gefunden werden.

| Zeit in<br>min p.i. | Virusstämme |             |      |     |
|---------------------|-------------|-------------|------|-----|
|                     | RAC-H       | Prevaccinol | P-15 | P-1 |
| 2                   | 477         | 277         | 56   | 12  |
| 10                  | 47          | 3           | 7    | -   |
| 30                  | -           | -           | -    | -   |

Tab. 3: Virusnachweis im Blut (PBE/1,0 ml Blut) in zunehmenden Zeitabständen nach intravenöser Inokulation von 1,0 ml Virussuspension

### 3.2.3. Leukozytäres Blutbild

Während des gesamten Versuchsablaufes wurde die Leukozytenzahl der Versuchstiere in Zeitabständen bestimmt und eine Leukozytendifferenzierung durchgeführt. Damit sollten Anhaltspunkte für das Haften der einzelnen

Herpesvirus equi 1-Stämme im Goldhamster, für die Dauer der Inkubationszeit und für den Grad der klinischen Erkrankung gewonnen werden. In den Abbildungen 1 - 4 sind in einer Kurve die Leukozytenzahlen und in Säulen der prozentuale Anteil im Verhältnis Lymphozyten zu neutrophilen Granulozyten eingetragen. Durch schwarze oder weiße Balken wurden die Zeitabschnitte gekennzeichnet, in welchen Virusantigen im Blut (schwarzer Balken) und mittels Immunfluoreszenz in der Leber (weißer Balken) nachgewiesen wurde. Mit überlebenden Tieren wurde der Beobachtungszeitraum bei den Stämmen RAC-H und P-15 bis 96 Stunden und beim Stamm Prevaccinol bis 144 Stunden ausgedehnt, um eine beginnende Normalisierung des leukozytären Blutbildes zu erfassen. Die Versuche mit dem Virusstamm P-1 erstreckten sich über 48 Stunden. Aus den Ergebnissen von je 3 Tieren wurde der Mittelwert gebildet und als Beurteilungsgrundlage benutzt. Die Werte für die prozentualen Anteile der eosinophilen Granulozyten und der Monozyten an der Leukozytenzahl sind nicht in die Abbildung aufgenommen.

Nach der intraperitonealen Inokulation der Virussuspensionen steigt die Leukozytenzahl bei allen 4 Virusstämmen (Abb. 1 - 4) an, um spätestens nach 6 Stunden ihren Ausgangswert wieder zu erreichen. Im gleichen Zeitraum steigt in dem normalerweise lymphozytären Blutbild des Goldhamsters bei den Stämmen RAC-H, Prevaccinol und P-15 der Anteil der Granulozyten auf über 50 % der Leukozytengesamtzahl. Bei den mit dem Stamm P-1 infizierten Goldhamstern ist der Granulozytenanstieg nicht so hoch wie bei den anderen Stämmen, jedoch weist er gegenüber dem Ausgangswert Signifikanz auf. Eine Tendenz zur Herstellung des normalen Verhältnisses von Lymphozyten zu Leukozyten ist darin zu sehen, daß bei allen Versuchsgruppen in der 18. Stunde p.i. die Lymphozyten wieder einen Wert von über 50 % der Leukozytenzahl erreicht hatten. In einem Kontrollversuch, bei dem mehrere

Abb. 1-4: Leukozytenzahl, Differentialblutbild und virämische Phasen sowie fluoreszenzserologische Leberbefunde nach der intraperitonealen Infektion von Goldhamstern mit verschiedenen Herpesvirus equi 1-Stämmen

Abb. 1:  
Infektion mit dem Virusstamm RAC-H

Abb. 2:  
Infektion mit dem Virusstamm Prevaccinol

Abb. 3:  
Infektion mit dem Virusstamm P-15

Abb. 4:  
Infektion mit dem Virusstamm P-1



weißer waagerechter Balken:  
Nachweis von Virusantigen in der Leber  
mittels Immunfluoreszenz



schwarzer waagerechter Balken:  
Nachweis von infektiösem Virus im Blut  
durch den Plaque-Test



durchgezogene Linie:  
Leukozytenwerte



schwarze Säule:  
Lymphozyten in % der Leukozytenzahl



weiße Säule:  
Granulozyten in % der Leukozytenzahl

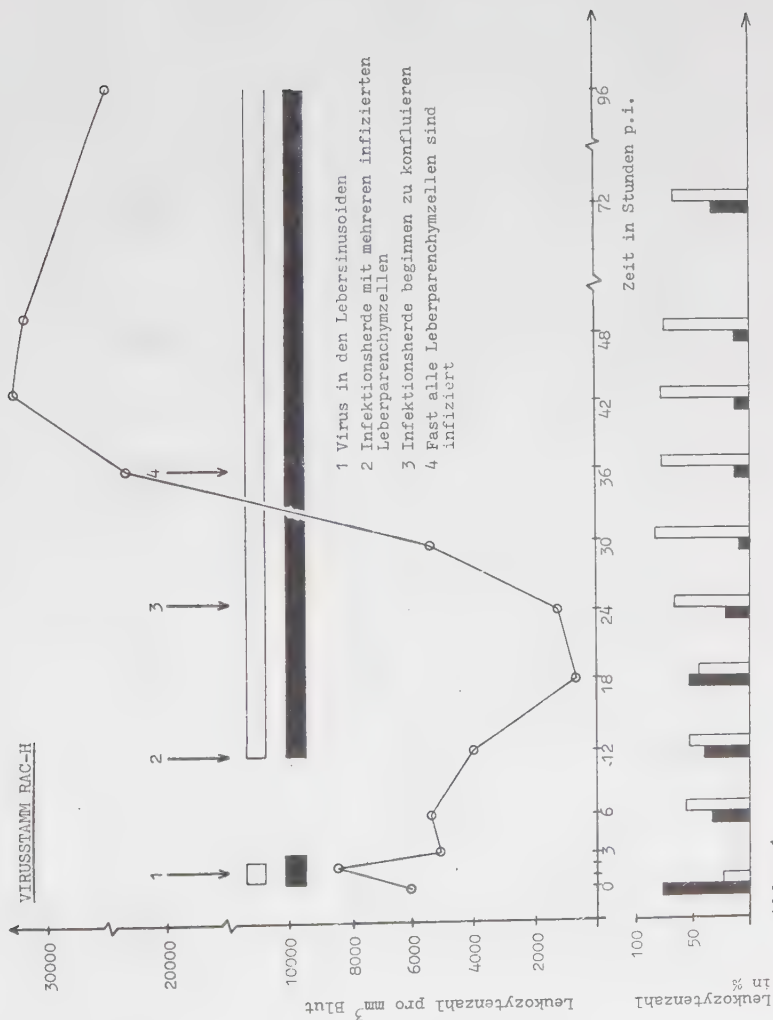


Abb. 1

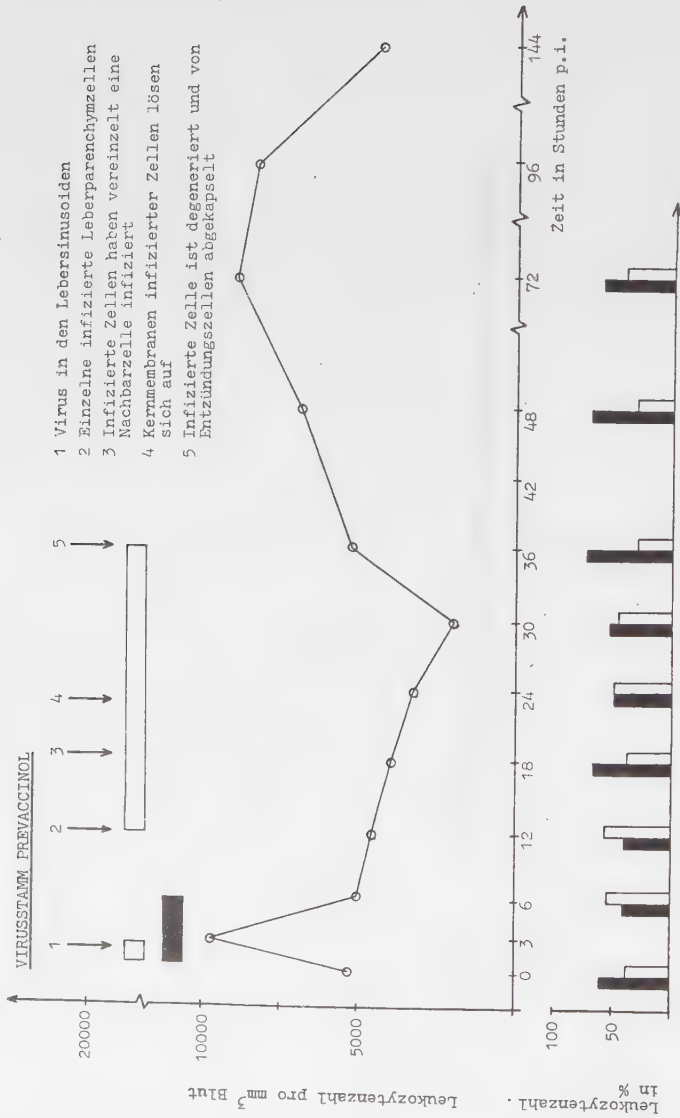


Abb. 2

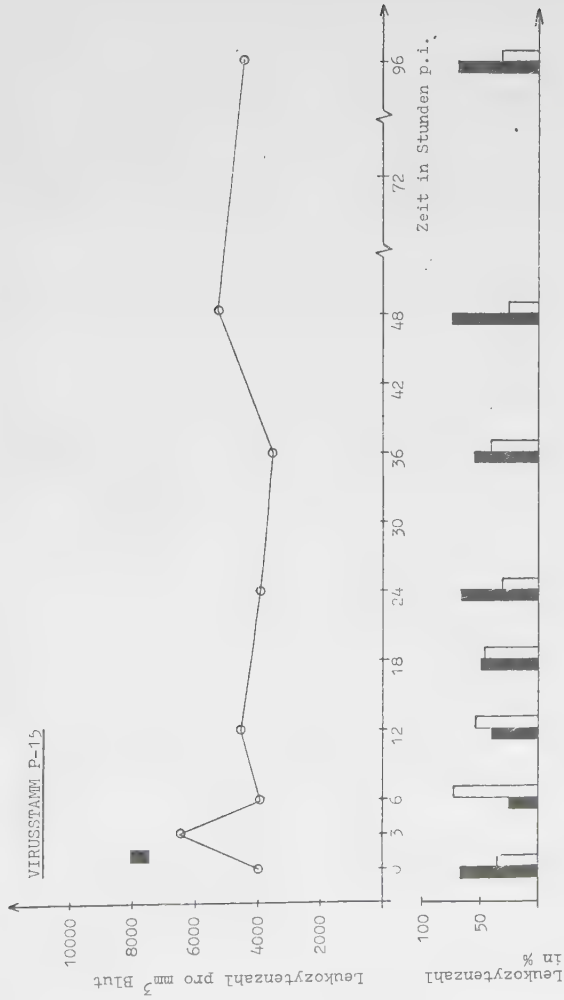


Abb. 3



Hamster 0,5 ml Medium einer nicht infizierten Schweinenieren-Zellkultur intraperitoneal injiziert bekamen, wurden die gleichen Veränderungen des Blutbildes festgestellt. Mithin dürfte es sich bei der zu Beginn des Versuchs aufgetretenen Änderung des Blutbildes nicht um eine durch die Virusinfektion induzierte Zellverschiebung, sondern um eine Reaktion auf die Inokulation des Zellmediums gehandelt haben.

Bei den Stämmen RAC-H (Abb. 1) und Prevaccinol (Abb. 2) beginnt nach der 6. Stunde p.i. eine Phase der Leukopenie, die beim Stamm RAC-H schneller erfolgt und niedrigere Werte als beim Stamm Prevaccinol erreicht. Ab der 18. (RAC-H) bzw. der 30. Stunde (Prevaccinol) steigt die Anzahl der weißen Blutzellen über ihren Normalwert hinaus an, und zwar durch eine Zunahme der Granulozyten. Der Anstieg geschieht beim Stamm RAC-H wiederum schneller und erreicht einen höheren Endwert als beim Stamm Prevaccinol. Nach 48 (RAC-H) bzw. 72 Stunden (Prevaccinol) bahnt sich der Rückgang zu den Normalwerten an. Auf Grund des Verhaltens des leukozytären Blutbildes wurde für den Stamm Prevaccinol ebenfalls auf eine Virusvermehrung im Hamster geschlossen, obwohl die Tiere keine objektivierbaren Krankheitsanzeichen zeigten. Die Inkubationszeit war gegenüber der Inkubationszeit des RAC-H Virusstammes verlängert, das Ausmaß der erfolgten Gewebsschädigungen mußte auf Grund der relativ geringen Leukozytose als unbedeutend angesehen werden.

Der Verlauf der Kurve für die Veränderungen der Leukozytenzahl nach der Infektion mit dem Stamm P-15 (Abb. 3) ähnelt mit einer zeitlichen Verlangsamung den entsprechenden Kurvenverläufen der Stämme RAC-H und Prevaccinol. Der Abfall und der erneute Anstieg der Zahl der weißen Blutzellen weist jedoch keine Signifikanz auf. Dagegen liegt die Zunahme des Anteils der Granulozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten außerhalb der Standardabweichung.

Eine Reaktion der Versuchstiere auf die Virusinokulation konnte auf Grund des leukozytären Blutbildes nicht völlig ausgeschlossen werden.

Nach der Infektion der Hamster mit dem Stamm P-1 (Abb.4) veränderte sich das leukozytäre Blutbild, abgesehen von der Injektionsreaktion, nicht. Daraus ist zu schließen, daß der Stamm P-1 in der verabreichten Dosis für den Goldhamster nicht pathogen war.

### 3.2.4. Untersuchung der Leber mit Hilfe der Immunfluoreszenz

Auf Grund von Untersuchungen, die MIMS (58) durchführte, kommt den Makrophagen bei dem Haftungsgeschehen des Virus eine besondere Bedeutung zu. Diese Tatsache gab mir Anlaß, das Auftreten von Virusantigen besonders in den Lebersinusoiden mit der Immunfluoreszenz nachzuweisen.

Weiterhin wurde der zeitliche Ablauf des Infektionsgeschehens in der Leber an den mit dem Virusstamm RAC-H infizierten Tieren bestimmt. Auf Grund der Veränderungen des leukozytären Blutbildes konnte zumindest auch für die Virusstämme Prevaccinol und P-15 eine Vermehrung im Hamsterorganismus nicht ausgeschlossen werden. Deshalb wurden auch Leberschnitte von den Hamstern, die mit den Stämmen Prevaccinol, P-15 und P-1 infiziert worden waren, während der Versuchsdauer mittels der Immunfluoreszenz auf Virusvermehrung in den Parenchymzellen untersucht.

In der 1. und 2. Stunde p.i. konnte virusspezifisches Antigen des RAC-H-Stammes in den Sinusoiden vereinzelt nachgewiesen werden. Die Intensität der Fluoreszenz war jedoch nur gering. In der 12. Stunde p.i. ließen sich bei schwacher Vergrößerung mehrere fluoreszierende Herde erkennen, die sich aus wenigen infizierten Leberzellen zusammensetzten und von Entzündungszellen umgeben waren. Der Umfang dieser Herde hatte in der 18. Stunde p.i. zugenommen. Nach 24 Stunden hatten sie sich der-

artig vergrößert, daß benachbarte Herde zu konfluieren begannen. Die Mehrzahl der Leberparenchymzellen schien in der 36. Stunde p.i. infiziert zu sein. Dieser Prozeß war in der 48. Stunde p.i. bei überlebenden Tieren so weit fortgeschritten, daß fast alle Parenchymzellen in das Infektionsgeschehen einbezogen worden waren.

Auch bei dem Virusstamm Prevaccinol wurde in der 1. und 2. Stunde p.i. eine spezifische Fluoreszenz in den Sinusoidwandungen nachgewiesen. In der 12. Stunde p.i. wurden einige spezifisch fluoreszierende Leberparenchymzellen beobachtet (Abb. 5). In der 18. Stunde p.i. hatte sich die Zahl der fluoreszierenden Parenchymzellen geringfügig vermehrt. Erste Anzeichen für eine Degeneration der virushaltigen Zellen bemerkte man in der 24. Stunde p.i., als sich die Kernmembranen vereinzelt auflösen begannen (Abb. 6). 36 Stunden p.i. hatten die infizierten Zellen ihre äußere Struktur verloren und waren von Entzündungszellen umgeben (Abb. 7). In diesen phagozytierenden Zellen konnte keine spezifische Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die polymorphkernigen Granulozyten besaßen schwache Eigenfluoreszenz.

Das P-15-Virusantigen konnte nur in der 1. Stunde p.i. in den Sinusoiden nachgewiesen werden. Infizierte Parenchymzellen wurden im weiteren Versuchsablauf nicht gesehen.

Während des ganzen Versuchs mit dem Virusstamm P-1 konnte niemals spezifische Fluoreszenz beobachtet werden.

Eine zusammenfassende Darstellung der beschriebenen Ergebnisse enthält die Tabelle 4.

Abb. 3 - 7: Fluoreszenzzerologischer Nachweis der Virusvermehrung in einer  
Leberparenchymzelle nach Infektion eines Goldhamster mit  
0,5 ml Prevacinol, 480 fache Vergrößerung

Abb. 5: 12 Stunden p.i.



Abb. 6: 24 Stunden p.i.



Abb. 7: 36 Stunden p.i.



| Stunden<br>p.i. | RAC-H                                                | Virusstämme                                                                                           |                                             |     |
|-----------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----|
|                 |                                                      | Prevaccinol                                                                                           | P-15                                        | P-1 |
| 1               | Fluoreszenz in den Sinusoiden                        | Fluoreszenz in den Sinusoiden                                                                         | sehr schwache Fluoreszenz in den Sinusoiden | -   |
| 2               | Fluoreszenz in den Sinusoiden                        | Fluoreszenz in den Sinusoiden                                                                         | -                                           | -   |
| 12              | Herde von 5-10 fluoreszierenden Leberparenchymzellen | Wenige, einzeln liegende fluoreszierende Parenchymzellen                                              | -                                           | -   |
| 18              | Fluoreszierende Herde nehmen an Umfang zu            | Anzahl der fluoreszierenden Zellen hat geringfügig zugenommen                                         | -                                           | -   |
| 24              | Fluoreszierende Herde beginnen zu konfluieren        | Kernmembranen fluoreszierender Zellen lösen sich auf                                                  | -                                           | -   |
| 36              | Die Mehrzahl der Parenchymzellen zeigt Fluoreszenz   | Fluoreszierende Parenchymzellen haben ihre Struktur verloren und werden von Entzündungszellen umgeben | -                                           | -   |
| 48              | Fast alle Parenchymzellen fluoreszieren              | Nur noch vereinzelt Granulozyten im Leberpräparat                                                     | -                                           | -   |

Tab. 4: Zusammenfassende Darstellung der fluoreszenzserologischen Ergebnisse von Hamsterleberpräparaten nach intraperitonealer Infektion mit den Herpesvirus equi 1-Stämmen RAC-H, Prevaccinol, P-15 und P-1

Die Aufnahmegeschwindigkeit und die Zeitdauer der nachweisbaren Persistenz der Herpesvirus equi 1-Stämme in den Lebermakrophagen wurden nach intravenöser Inokulation von 1,0 ml Virussuspension untersucht.

Die Vorgänge waren bei dem hochtitrigen Impfstoffstamm Prevaccinol am deutlichsten zu erkennen und sind in den Abbildungen 8 - 10 dargestellt. In einigen Leberläppchen konnte bereits 3 min p.i. Virusantigen nachgewiesen werden. Auf ungefähr der Hälfte der Strecke von der Peripherie zur Zentralvene fluoreszierten die Sinusoidwandungen (Abb. 8). Die Tatsache, daß sich das Virusantigen zu diesem Zeitpunkt nur in den Sinusoidzellen an der Peripherie des Leberläppchens befand, deutete auf die außerordentliche Schnelligkeit der Aufnahme des Virus hin. Nach 10 min p.i. war fast in allen Sinusoidwandungen intensive Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 9). Das Bild des "diffusen Leuchtens" der Sinusoidwände in der 3. und 10. min p.i. hatte sich nach 30 min verändert. Die virusspezifische Fluoreszenz schien sich nun auf einzelne Zellen der Sinusoidwand zu konzentrieren und wies eine "körnige" Struktur auf (Abb. 10). Nach einer Stunde glich das Bild den Erscheinungen, wie sie in der 30. min p.i. beobachtet worden waren, nur hatte die Leuchtintensität der Fluoreszenz abgenommen. 2 Stunden p.i. konnte nur noch ganz vereinzelt eine spezifische Fluoreszenz wahrgenommen werden.

### 3.2.5. Versuche mit Peritonealmakrophagen

Die Empfänglichkeit eines Organismus für unterschiedlich pathogene Virusstämme manifestiert sich unter anderem im unterschiedlichen Verhalten seiner Peritonealmakrophagen gegenüber diesen Virusstämmen. Aus diesem Grund sollte das Verhalten der 4 Herpesvirus equi 1-Stämme in Peritonealmakrophagen-Kulturen des Goldhamsters als Modellsystem untersucht werden.

Abb. 8 - 10: Fluoreszenzenomologisches Erzei. i. s. s. von Aufnahme von Viruspartikeln  
des Virusstammes Prevaccinol durch Sinusoidzellen in der Leber des  
Goldhamsters nach intravenöser Injektion von 1,0 ml Prevaccinol.  
480 fache Vergrößerung

Abb. 8: 3 Minuten p.i.



Abb. 9: 10 Minuten p.i.



Abb. 10: 20 Minuten p.i.



### Virusaufnahme:

Um eine Virusaufnahme durch die Zellen festzustellen, wurden Makrophagenkulturen mit den 4 Virusstämmen infiziert und der Gehalt an infektiösem Virus im Kulturmedium und in den Zellen in zunehmenden Zeitabständen p.i. bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 11 - 14 aufgezeichnet. Bei den Stämmen RAC-H (Abb. 11), Prevac-inol (Abb. 12) und P-1 (Abb. 13) nahm zu Beginn des Versuchs der Gehalt des Mediums an infektiösem Virus in den Röhrchen mit Makrophagen schneller ab als in den Kontrollröhrchen ohne Makrophagen. Dies kann wohl nur dahingehend gedeutet werden, daß das Virus an die Zellen gebunden worden war. In der weiteren Zeit glich die Abnahme des infektiösen Virus in den Zellkulturröhrchen der Abnahme durch Wärmeinaktivierung in den Kontrollröhrchen. Dies kann bedeuten, daß die Aufnahmefähigkeit der Zellen für das Virus begrenzt war oder, daß ein Gleichgewicht zwischen dem von den Makrophagen aufgenommenen Virus und den aus ihnen wieder infektiös abgegebenen Viruspartikeln eingetreten war.

Der Stamm P-15 (Abb. 14) zeigte in der Zellkultur ein völlig anderes Verhalten. Nach einem kurzen, der Wärmeinaktivierung entsprechenden Abfall verdoppelte sich in 9 Stunden der Gehalt des Mediums an plaquebildenden Einheiten gegenüber dem Ausgangswert. Dieses Ergebnis war in Wiederholungsversuchen reproduzierbar. Da die Zeit für eine Virusvermehrung zu kurz war, ist anzunehmen, daß Virusaggregate beim Kontakt mit den Zellmembranen in einzelne infektiöse Viruspartikel zerfielen, ein Vorgang, der die Zunahme der PBE/1,0 ml im untersuchten Medium erklären könnte. War die Auflösung der Virusaggregate erst einmal erfolgt, dann verlief die Wärmeinaktivierung des Virus schneller als in den Kontrollröhrchen vorausgesetzt, daß die Makrophagen kein Virus aufgenommen hatten.

Abb. 11

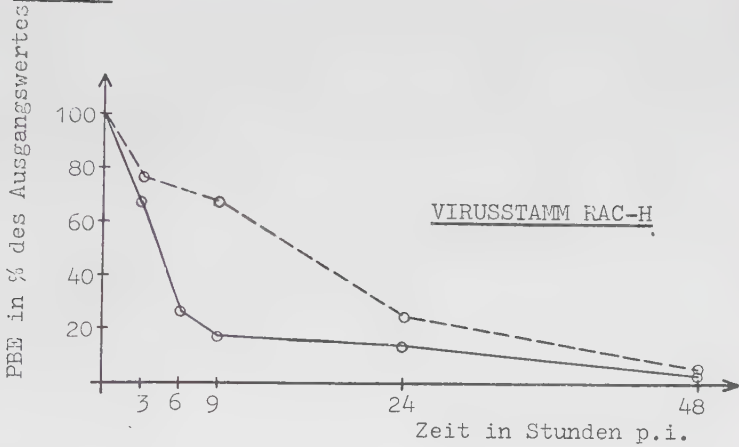


Abb. 12

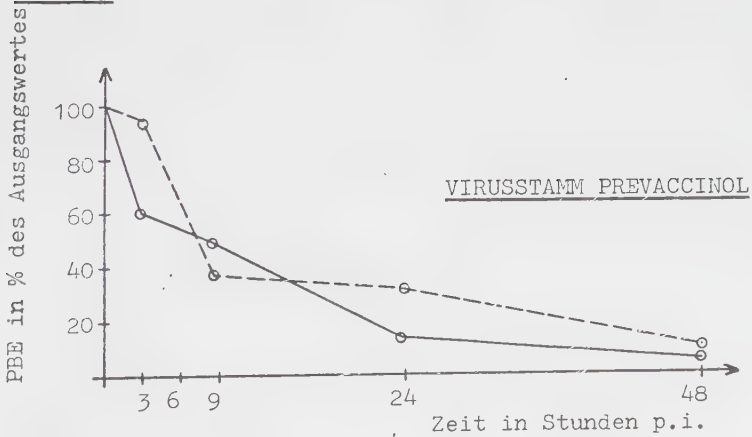


Abb. 11 und 12 : Abnahme von infektiösem Virus im Medium einer Makrophagenkultur nach Infektion mit den Virusstämmen RAC-H (Abb.11) und Prevaccinol (Abb.12). Angabe in % der PBE des Ausgangswertes.  
— Makrophagenmedium  
--- Kontrollmedium ohne Makrophagen

Abb.13

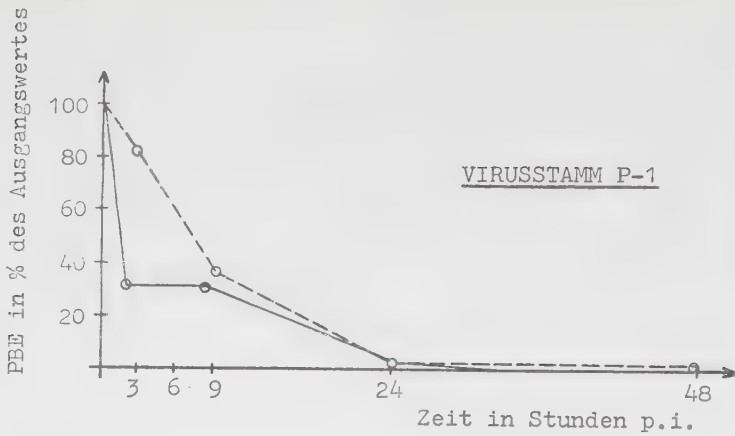


Abb.14

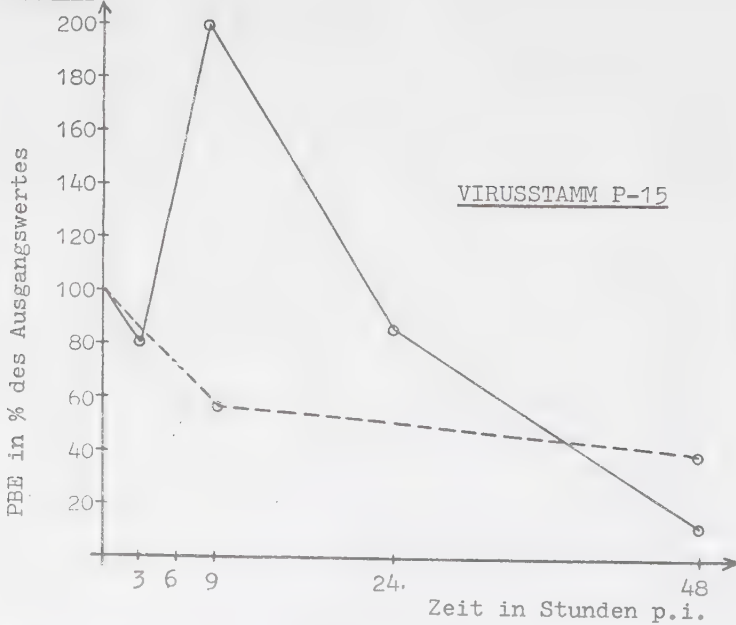


Abb. 13 und 14 : Abnahme von infektiösem Virus im Medium einer Makrophagenkultur nach Infektion mit den Virusstämmen P-1 (Abb.13) und P-15 (Abb.14). Angabe in % der PBE des Ausgangswertes

— Makrophagenmedium  
 --- Kontrollmedium ohne Makrophagen

Die Menge des an die Makrophagen gebundenen infektiösen Virus ist in Abbildung 15 dargestellt. Die Makrophagen, die mit den Stämmen RAC-H, Prevaccinol und P-1 infiziert worden waren, lagerten anfangs schnell Viruspartikel an. Im weiteren Versuchsverlauf nahm die Menge der zellgebundenen infektiösen Viruspartikel kontinuierlich ab. Bei dem Stamm RAC-H erfolgte nach der 9. Stunde p.i. kein weiterer Abfall. Einschränkend muß vermerkt werden, daß gegen Ende des Versuchs auch die Anzahl der Zellen abgenommen hatte.

Im Gegensatz dazu haftete an den Makrophagen nach der Infektion mit dem Stamm P-15 anfangs nur wenig infektiöses Virus. Die zellgebundenen Viruspartikel nahmen bis zur 9. Stunde gering zu. Danach kam es wieder zu einer Reduktion der Virusmengen.

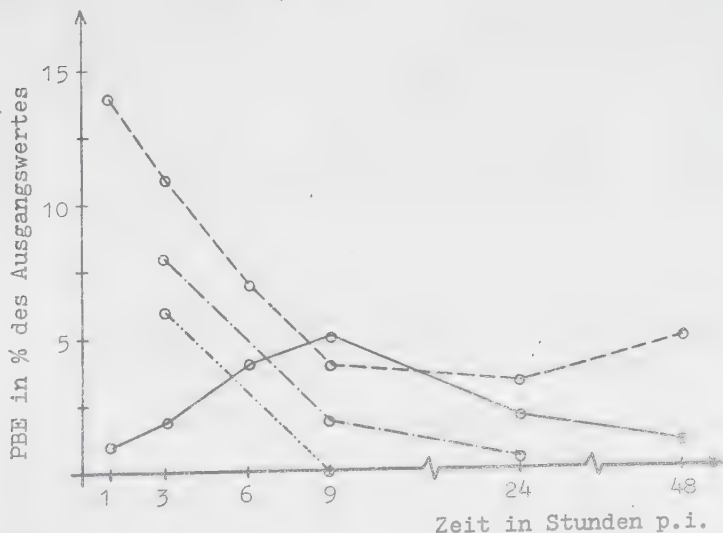


Abb. 15: Zellgebundenes infektiöses Virus nach Infektion von Makrophagenkulturen mit Herpesvirus equi 1-Stämmen  
 ----- Stamm RAC-H  
 ———— Stamm Prevaccinol  
 ..... Stamm P-1  
 ———— Stamm P-15  
 Angaben in % der PBE des Ausgangswertes

### Verhalten der Virusstämme in Makrophagen:

Um die Vermutung zu erhärten, daß einmal aufgenommenes Virus aus den Makrophagen wieder infektiös austreten kann, wurden mit den 4 Virusstämmen infizierte Makrophagenkulturen nach 9-stündiger Inkubationszeit sorgfältig gewaschen und erneut mit Medium beschickt. Anschließend durchgeführte Kontrollen ergaben, daß sich im Überstand kein infektiöses Virus mehr befand. Nach 24 und 48 Stunden wurde das Kulturmedium nochmals im Plaque-Test auf Infektiosität untersucht. Beim Stamm RAC-H wurden 24 und 48 Stunden p.i. und beim Stamm Prevaccinol erst nach 48 Stunden p.i. erneut geringe Mengen infektiöser Viruspartikel im Medium gefunden (s. Tab. 5). Dieser Befund läßt die Deutung zu, daß bei diesen beiden Stämmen infektiöse Viruspartikel aus den Makrophagen ausgetreten sind.

| Zeit in<br>Std. p.i. | Virusstämme |             |      |     |
|----------------------|-------------|-------------|------|-----|
|                      | RAC-H       | Prevaccinol | P-15 | P-1 |
| 9                    | -           | -           | -    | -   |
| 24                   | 0,4         | -           | -    | -   |
| 48                   | 0,5         | 0,25        | -    | -   |

Tab. 5: Infektiöses Virus im Makrophagenmedium  
nach Waschen der Makrophagen 9 Stunden p.i.  
Angaben in % der PBE des Ausgangswertes

### Mikroskopische Untersuchung der infizierten Makrophagenkulturen:

Die Untersuchung der morphologischen Veränderungen der Makrophagen wurde mittels Folienkulturen, wie bei Material und Methoden beschrieben, durchgeführt.

Bei den Stämmen RAC-H, Prevaccinol und P-1 trat nach der Infektion, im Gegensatz zu den Kontrollpräparaten (Abb. 16 u. 17), eine Verklumpung der Zellen ein, die

in der 9. Stunde p.i. ihren Höhepunkt erreichte. Beim Stamm RAC-H war die stärkste Zusammenballung der Zellen zu beobachten, wie die Abbildungen 18 und 19 zeigen. In vielen Fällen hatten sich die runden Zellen der Kultur an Retikulumzellen gleichende Makrophagen angelagert. Das Zytoplasma schien gelockert und vermehrt mit Vakuolen durchsetzt. Die Verklumpungen blieben bis zum Versuchsende 48 Stunden p.i. bestehen, jedoch nahm die Zahl der Zellen stark ab.

Die gleichen Zellveränderungen traten in den mit dem P-15-Stamm infizierten Makrophagenkulturen nicht auf. Das Aussehen der Zellen hatte sich jedoch im Vergleich mit dem Kontrollpräparat verändert (Abb. 20 u. 21). Die Zellen hatten sich zusammengezogen und abgekugelt, so daß ihr Zellkern in dem verdichteten Zytoplasma kaum mehr auszumachen war. Im weiteren Verlauf des Versuches nahm die Zellzahl auch in diesen Kulturen gegenüber der Zellzahl in den Kontrollpräparaten stark ab.

Abb. 16

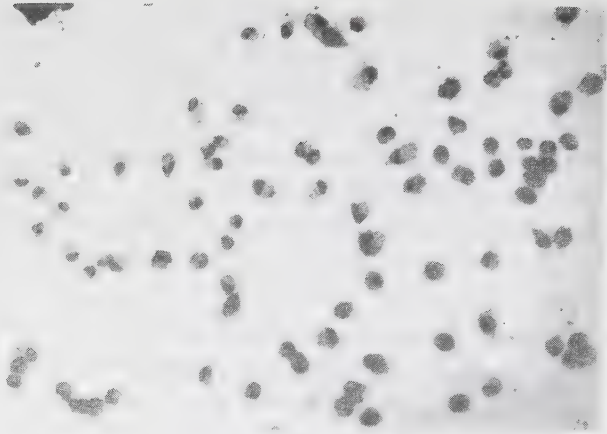


Abb. 17

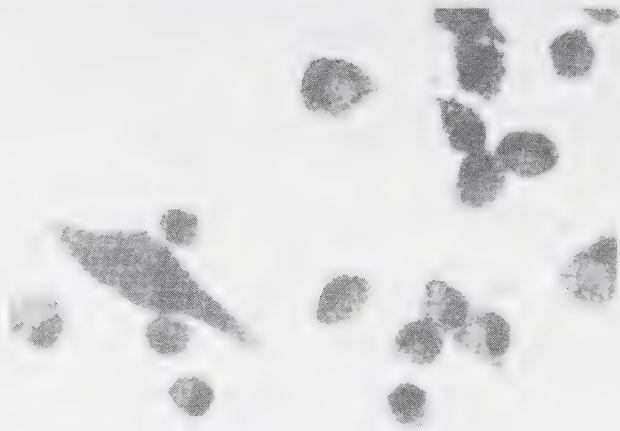


Abb. 16 und 17: Uninfizierte Goldhamster-Peritoneal-  
makrophagenkultur

Abb.16: 80 fache Vergrößerung

Abb.17: 300 fache Vergrößerung

Abb. 18

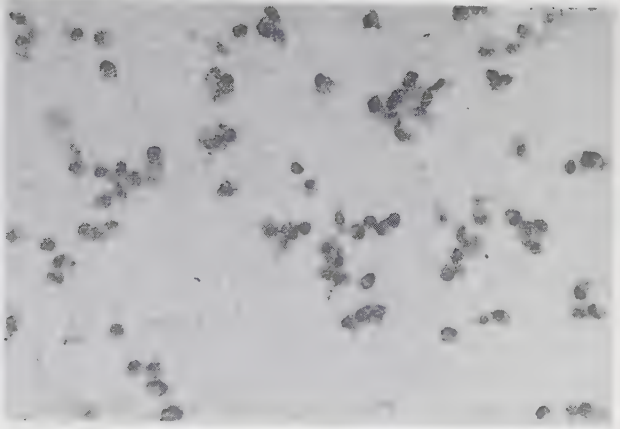


Abb. 19

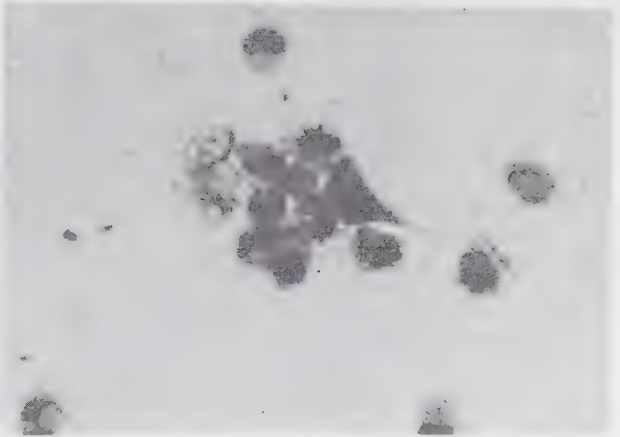


Abb. 18 und 19: Mit dem Virusstamm RAC-H infizierte Gold-  
hamster-Peritonealmakrophagenkultur  
9 Stunden p.i.

Abb. 18: 80 fache Vergrößerung

Abb. 19: 300 fache Vergrößerung

Abb. 20

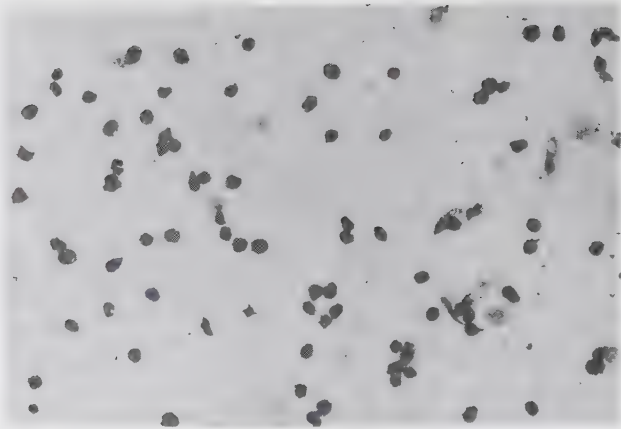


Abb. 21

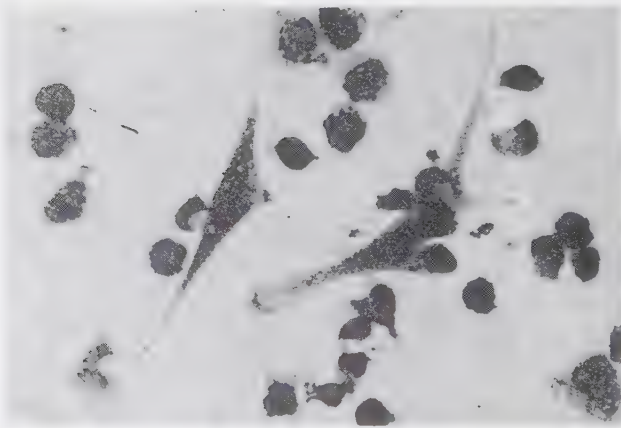


Abb. 20 und 21: Mit dem Virusstamm P-15 infizierte Goldhamster-Peritonealmakrophagenkultur  
9 Stunden p.i.

Abb. 20: 80 fache Vergrößerung

Abb. 21: 300 fache Vergrößerung

#### 4. DISKUSSION

Das Verhalten der 4 Herpesvirus equi 1-Stämme RAC-H, Prevaccinol, P-15 und P-1 in der Bauchhöhle, im Blut und in der Leber von intraperitoneal infizierten Goldhamstern ist auf Grund der erzielten Ergebnisse in Abbildung 22 schematisch dargestellt.

Obwohl Viruspartikel vereinzelt in Makrophagen nachgewiesen wurden, scheint es in der Bauchhöhle des Goldhamsters nicht zur Vermehrung des Virus zu kommen. Diese Feststellung deckt sich nicht mit Ergebnissen, die BESWICK (11), JOHNSON (41) und JONES (43) nach der intraperitonealen Infektion der juvenilen Maus mit Herpesvirus simplex und Herpesvirus tamarinus erzielten. Die Autoren fanden eine erste Virusvermehrung in den Peritonealmakrophagen und in den Serosazellen des Peritoneums und konnten in der 24. Stunde p.i. feststellen, daß auch die Leberkapsel in das Infektionsgeschehen einbezogen worden war. Sie fanden, daß 48 Stunden p.i. die unter der Leberkapsel liegenden Parenchymzellen infiziert waren und konnten das nach Färbung mit fluoreszierenden Antikörpern durch eine typische subkapsuläre Fluoreszenz erhärten. Ähnliche Erscheinungen, die auf ein Übergreifen der Infektion von der Bauchhöhle direkt auf die Leber hindeuteten, wurden bei den eigenen Untersuchungen bei keinem Stamm nachgewiesen. Deshalb ist wohl die Annahme begründet, daß die Leber durch das Virus nach der intraperitonealen Inokulation des Goldhamsters mit dem Herpesvirus equi 1 über den Blutweg infiziert wird.

Während der ersten virämischen Phase der Stämme RAC-H, Prevaccinol und P-15, die beim Stamm Prevaccinol am längsten dauerte, fand sich infektiöses Virus nur im Blutplasma.

Auch bei dem niedertitrigen Stamm P-1 konnte man, trotz der niedrigen Infektionsdosis, eine primäre Virämie

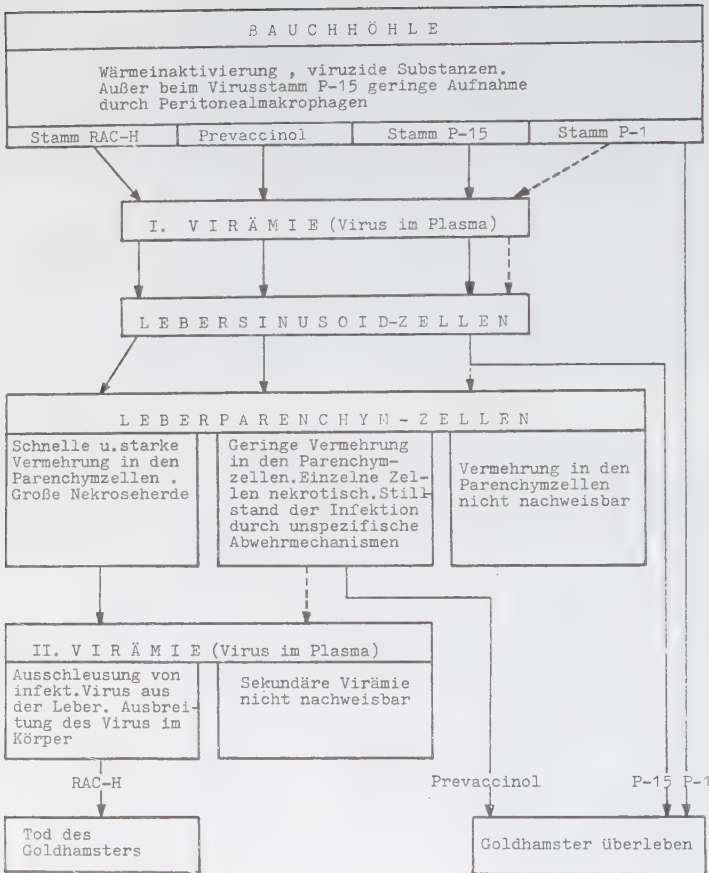


Abb. 22: Schematische Darstellung der Haftung und Ausbreitung der Herpesvirus equi 1-Stämme RAC-H, Prevaccinol, P-15 und P-1 im Goldhamster nach intraperitonealer Infektion

-----nicht gesicherter Schritt im Infektionsgeschehen

nicht ausschließen. Hinzu kommt, daß die Elimination des Virus aus dem Blut sehr schnell erfolgt war und mit dem Plaque-Test die sehr geringe Virusmenge nicht erfaßt werden konnte.

Eine Aufnahme der Virusstämme RAC-H, Prevaccinol und P-15 durch die Sinusoidzellen der Leber konnte während der primären Virämie nachgewiesen werden.

Über das Verhalten der Herpesvirus equi 1-Stämme in den Sinusoidzellen, dem MIMS (58) die Schlüsselrolle bei der Haftung der hepatotropen Virusarten zuschreibt, konnte aus den Untersuchungsergebnissen folgendes entnommen werden:

Intravenös injiziertes Virus verteilte sich nach 10 min über alle Zellen der Sinusoidwand. Nach einer halben Stunde schien das Virus sich in einzelnen Zellen zu konzentrieren (Abb. 10). Ob es sich dabei um Kupffer'sche Sternzellen handelte, konnte nicht entschieden werden. Die virusspezifische Fluoreszenz war in der 2. Stunde p.i. aus diesen Zellen fast völlig verschwunden. Dieses, nach MIMS, relativ "langsame" Erlöschen der Fluoreszenz läßt sich mit dem Abbau der Herpesvirus equi 1-Stämme in den phagozytierenden Zellen der Sinusoidwand erklären. Virus, das in den Sinusoidzellen in einen Vermehrungszyklus eintritt, ist nach MIMS dort schon nach 30 min nicht mehr nachzuweisen, da es sich bereits in der Ekliipse-Phase befindet. Die Untersuchungen von Leberschnitten nach der intraperitonealen Infektion des Goldhamsters ergaben während der ganzen Versuchsdauer keine Hinweise auf eine Vermehrung der untersuchten Virusstämme in den Sinusoidzellen.

Da die fluoreszenzserologische Untersuchungstechnik keine ausreichende Beantwortung der Frage nach dem Verhalten der einzelnen Virusstämme in den Sinusoidzellen zuließ, wurde versucht, mit Peritonealmakrophagen als Modell über das Verhalten der Virusstämme gegenüber den

Lebermakrophagen Näheres zu erfahren. Auch andere Autoren (4, 68) bedienten sich der Peritonealmakrophagen, um Untersuchungen über die Pathogenität von Virusarten durchzuführen.

SOMMERVILLE (72) und JOHNSON (42) konnten mit der Fluoreszenztechnik zeigen, daß das Herpesvirus simplex von Peritonealmakrophagen der Maus aufgenommen wird. Bei den Stämmen RAC-H, Prevaccinol und P-1 war das Virus in Kulturen von Peritonealmakrophagen des Goldhamsters schnell an die Zellen gebunden. Das Zytoplasma der Zellen war verstärkt vakuolisiert, wie es nach der Aufnahme von Substanzen durch die phagozytierenden Zellen beschrieben wird. Die Anlagerung der runden Makrophagen der Kultur an die retikulären Zellen (Abb. 19) spricht auch dafür, daß Viruspartikel von den Makrophagen aufgenommen wurden. STUART und DAVIDSON (73) beobachteten, daß runde Peritonealmakrophagen nach Phagozytose von Hefen oder Bakterien sich innerhalb von 4 - 8 Stunden an die kaum phagozytierenden retikulären Zellen anlagerten. Über Protoplasmabrücken wurde aus den runden Makrophagen Antigen in die retikulären Zellen überführt. Die Autoren diskutierten dieses Verhalten als einen Schritt zur Stimulierung der Immunantwort und vermuteten, daß diese Stimulierung auch nach der Aufnahme von Viruspartikeln erfolgt.

Phagozytiertes Antigen der Stämme RAC-H, Prevaccinol und P-1 wurde in den Makrophagen inaktiviert, jedoch schien die Angreifbarkeit der Stämme unterschiedlich zu sein. Nach Phagozytose des Stammes P-1 konnte in den thermisch gebeugten Makrophagen nach 9 Stunden kein infektiöses Virus mehr nachgewiesen werden.

Ein geringer Teil der von den Makrophagen aufgenommenen Viruspartikel des Stammes Prevaccinol war noch nach 24 Stunden infektiös, während beim Stamm RAC-H ab der 9. Stunde p.i. kein weiterer Abfall der Infektiosität beobachtet werden konnte. Die geringe Zunahme an PBE in

der 48. Stunde p.i. war nicht signifikant.

Der Stamm P-15 wurde in den in vitro Versuchen von den Makrophagen nicht aufgenommen. Die Zellen zeigten keine Vakuolen und verklumpten nicht. Vielmehr erschienen sie verdichtet und abgekugelt. Die Menge des zellgebundenen Virus war gering und entsprach in ihrer Zu- und Abnahme der Menge der infektiösen Viruspartikel in dem umgebenden Medium. Daraus wurde geschlossen, daß bei der Titration der aufgeschlossenen Zellen nur das an den Zellmembranen haftende Virus erfaßt wurde. Da die Zellen in der Kultur rasch degenerierten, ohne daß ein Vermehrungszyklus stattgefunden hatte, wurde eine toxische Schädigung der Makrophagen durch den Stamm P-15 angenommen. Ein toxischer Effekt hoher Virusdosen auf Zellkulturen ist des öfteren beschrieben worden (28, 36, 61). GRESSER und LANG (33) betonen hingegen, daß dieser Effekt in vivo nicht eintritt, weil im Organismus die hierzu notwendigen Viruskonzentrationen nicht vorkommen.

Bei dem Stamm P-15 konnte durch den Modellversuch in Peritonealmakrophagen kein Aufschluß über die Aufnahme und den Grad der Inaktivierung des Virus in den Lebersinusoïden gewonnen werden, obwohl durch Fluoreszenz in den Lebersinusoïden Virusantigen in der 1. Stunde p.i. nachgewiesen worden war.

TEUFEL (75) untersuchte die Aufnahme und das Verhalten der 4 Virusstämme in Makrophagenkulturen mit der Immunfluoreszenz. Die fluoreszenzserologischen Befunde entsprachen den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen. Die Möglichkeit eines Freiwerdens von infektiösen Viruspartikeln aus Makrophagen, die MIMS (58) bei einer Erschöpfung der Phagozytosefähigkeit beschreibt, ist in der Modellstudie mit Peritonealmakrophagen geprüft worden. Eine Überladung einzelner Zellen mit Antigen scheint auch in diesem Modell gegeben zu sein. NAHMIAS (60) fand, daß nur unter 1 % der Zellen einer mit Phyt hämagglutinin stimulierten Lymphozytenkultur nach der

Infektion mit Herpesvirus simplex Virus enthielt, während JOHNSON (42) in mit dem gleichen Virus infizierten Mäuse-Makrophagenkulturen nur in einer von 100 000 Zellen Virus in großen Mengen vorfand. Die Autoren deuteten dies dahin, daß nur Zellen eines gewissen Entwicklungszustandes für die Infektion empfänglich oder zur Phagozytose von Herpesvirus simplex in der Lage sind.

In den eigenen Untersuchungen konnte ein Austreten infektiöser Viruspartikel aus den Makrophagen festgestellt werden. Nach sorgfältigem Waschen der mit den 4 Virusstämmen infizierten Makrophagenkulturen ließ sich nach dem Waschvorgang kein infektiöses Virus im Überstand mehr nachweisen. Hingegen wurde im Kulturmedium beim Stamm RAC-H nach 24 und 48 Stunden p.i. und beim Stamm Prevaccinol allein nach 48 Stunden p.i. infektiöses Virus festgestellt. Die Menge des ausgeschleusten infektiösen Antigens war bei dem für den Goldhamster stärker pathogenen Stamm RAC-H größer als beim Stamm Prevaccinol.

Für die Stämme P-1 und P-15 verlief die Virustitration des Kulturmediums nach dem Waschen der Zellen immer negativ.

Die Untersuchungen der 4 Herpesvirus equi 1-Stämme am Modell der Peritonealmakrophagen des Goldhamsters und die Ergebnisse der Immunfluoreszenz lassen es möglich erscheinen, daß sich die 4 Stämme in den phagozytierenden Zellen der Lebersinusoide folgendermaßen verhalten: Alle Stämme werden zum großen Teil in den Lebersinusoiden aus dem Blut eliminiert. Bei dem Stamm P-15 wurde diese Eliminierung allein durch in vivo Versuche festgestellt.

Der Stamm P-1 wird in der verabreichten Dosis vollständig in den Sinusoidzellen inaktiviert, so daß die Haftung einer Infektion ausgeschlossen werden konnte. Ähnliches scheint für den Stamm P-15 zuzutreffen.

Die Virusstämme RAC-H und Prevaccinol besitzen in unterschiedlichem Maß die Fähigkeit, dem Abbau in den Sinusoidzellen zu widerstehen und infektiös wieder aus den Zellen auszutreten. Dadurch wird eine Infektion der Leberparenchymzellen ermöglicht. Auf Grund seiner größeren Widerstandsfähigkeit gegenüber der Inaktivierung infiziert der Stamm RAC-H die Leberparenchymzellen schneller und in größerer Anzahl als der Stamm Prevaccinol.

Für den Ausgang der Infektion mit den pathogenen Stämmen scheint weiterhin die Schnelligkeit der Virusvermehrung in den Leberparenchymzellen von Bedeutung zu sein. Bei hamsteradaptiertem Virus und auch beim Stamm RAC-H erfolgte die Vermehrung so schnell, daß unspezifische und erste virusspezifische Abwehrmaßnahmen des Organismus nicht wirksam werden konnten und die Erkrankung zum Tod des Tieres führte. Bei dem langsamen Vermehrungszyklus des attenuierten Impfstoffstammes Prevaccinol in der Goldhamsterleber konnten die erwähnten Abwehrmaßnahmen des Körpers die Ausbreitung der Infektion in der 36. - 48. Stunde p.i. eindämmen.

Nur beim Stamm RAC-H konnte nach der Vermehrung in der Leber ab der 12. Stunde p.i. eine sekundäre Virämie nachgewiesen werden. Während dieser 2. virämischen Phase befanden sich große Mengen von infektiösem Virus im Blutplasma, jedoch wurden auch an den Blutzellen geringe Mengen infektiöser Viruspartikel gefunden. Dies beschrieb auch JOHNSON (41) für die Virämie bei der Herpes simplex Virusinfektion der Maus. Da in den eigenen Untersuchungen weder an den Erythrozyten noch in den Leukozyten mittels der Immunfluoreszenz RAC-H-Antigen nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, daß bei der Virustitration der aufgeschlossenen Hamsterblutzellen Restvirus aus dem Plasma erfaßt worden ist. Die Lokalisation des Herpesvirus equi 1 in den Blutleukozyten während einer virämischen Phase, wie BRYANS (13) dies beim Pferd beschreibt, konnte unter den gegebenen Ver-

suchsbedingungen für den Goldhamster nicht bewiesen werden.

Die Veränderungen des leukozytären Blutbildes bei den infizierten Hamstern ließen sich in Beziehung zu dem unterschiedlichen Verhalten der 4 Herpesvirus equi 1-Stämme im Goldhamster setzen.

Die durch die Leukopenie gekennzeichnete Inkubationszeit war bei dem gegen unspezifische Inaktivierung widerstandsfähigeren Stamm RAC-H kürzer als beim Stamm Prevaccinol. Durch die rasche Vermehrung des RAC-H-Stammes traten schneller ausgedehntere Lebergewebsnekrosen auf. Dies drückte sich im leukozytären Blutbild durch einen eher beginnenden, steileren Anstieg der Leukozytenzahlen aus, die auch höhere Werte als beim Stamm Prevaccinol erreichten.

Beim Stamm P-15 lassen die Veränderungen des leukozytären Blutbildes eine Aussage über eine virusspezifische Reaktion offen, obwohl die fluoreszenzserologischen Untersuchungen der Leber negativ verliefen. Durch das von den übrigen Stämmen abweichende Verhalten in der Makrophagenkultur konnte auch bei der Modelluntersuchung nicht klargestellt werden, wie der Stamm sich im Hamsterorganismus verhält.

Der Virusstamm P-1 verursacht in der verabreichten Dosis keine Abweichung des leukozytären Blutbildes von der Norm. In der Makrophagenkultur war dieser Stamm inaktiviert worden und in der Leber konnte zu keinem Zeitpunkt des Versuches Virus nachgewiesen werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Haftung und die Ausbreitung der Herpesvirus equi 1-Stämme RAC-H, Prevaccinol, P-15 und P-1 im Goldhamster wurde untersucht.

Nach intraperitonealer Inokulation der 4 Virusstämme verschwand das Virus aus der Bauchhöhle und konnte bei den Stämmen RAC-H 3 Stunden, Prevaccinol 6 Stunden und P-15 1 Stunde im Blutplasma nachgewiesen werden. Der Stamm P-1 wurde nur kurzfristig in der Bauchhöhle gefunden.

Die Eliminierung dieser Stämme durch die Sinusoidzellen der Leber wurde für die Virusstämme RAC-H, Prevaccinol und P-15 mittels der Immunfluoreszenz beobachtet. In Kulturen von Peritonealmakrophagen wurden die Stämme RAC-H, Prevaccinol und P-1 von den Zellen aufgenommen. Der Virusstamm P-15 schien in vitro einen toxischen Effekt auf die Makrophagen auszuüben.

Der Stamm RAC-H vermehrte sich stark in den Parenchymzellen der Leber. Der Impfstoffstamm Prevaccinol führte nur zur Infektion weniger Parenchymzellen, und das Infektionsgeschehen erlosch 36 Stunden p.i. Die Inokulation des Stammes RAC-H führte zum Tod der Tiere, während die Hamster nach der Infektion mit den Stämmen Prevaccinol, P-15 und P-1 am Leben blieben.

Eine zweite virämische Phase wurde nur beim Stamm RAC-H festgestellt. Das Virus befand sich vorwiegend im Blutplasma.

Die unterschiedliche Pathogenität der 4 Virusstämme für den Goldhamster spiegelt sich im leukozytären Blutbild wieder.

Die Ergebnisse werden diskutiert.

## 6. SUMMARY

The adsorption and propagation of the 4 herpesvirus equi 1 strains RAC-H, Prevaccinol, P-15 and P-1 was studied in the golden hamster.

After i.p. inoculation of the 4 virus strains virus disappeared from the peritoneal cavity and was found for 3 hours (RAC-H), 6 hours (Prevaccinol) and 1 hour (P-15) in the blood plasma. Strain P-1 was detected in the peritoneal cavity only for a short time.

By means of immunofluorescence the elimination of the virus strains RAC-H, Prevaccinol and P-15 by the sinusoid cells of the liver was observed. Peritoneal macrophages in culture took off differently the strains RAC-H, Prevaccinol and P-1. The strain P-15 seemed to have a toxic effect on the cultivated macrophages.

The RAC-H virus strain multiplies in liver cells to a great amount, whereas in studies with the vaccine Prevaccinol only a few cells were infected and the infection ceased 36 hours p.i. The infection with the RAC-H strain caused the death of the animal. The hamster stayed alive after the inoculation of the virus strains Prevaccinol, P-15 and P-1.

A second viraemic phase was only observed using the virus strain RAC-H. The virus was mainly located in the blood plasma.

The different pathogenity of the 4 strains for the golden hamster was also reflected by the leucocyte response.

The results are discussed.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. ANDERSON, K. u. E.W. GOODPASTURE  
Infection of newborn Syrian hamsters with the  
virus of mare abortion (DIMOCK and EDWARDS)  
Amer. J. Path. 18, 555-561 (1942)
2. ARHELGER, R.B., R.W. DARLINGTON u. C.C. RANDALL  
An electron microscopic study of equine abortion  
virus infection in hamster liver  
Amer. J. Path. 42, 703-709 (1963)
3. ASCHOFF, L. u. K. KIYONO  
Zur Frage der großen Mononucleären  
Folia haematol. 15, 383-392 (1913)
4. BANG, F.B. u. A. WARWICK  
The effect of an avirulent and a virulent strain  
of Newcastle virus (myxovirus multiforme) on cells  
in tissue cultures  
J. Path. Bact. 73, 322-330 (1957)
5. BANG, F.B. u. A. WARWICK  
Macrophages and mouse hepatitis  
Virology 9, 715-717 (1959)
6. BANG, F.B. u. A. WARWICK  
Mouse macrophages as host cells for mouse hepatitis  
virus and the genetic basis of their susceptibility  
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 46, 1065-1075 (1960)
7. BARATAWIDJAJA, R.K., L.P. MORRISSEY u. N.A. LABZOFFSKY  
Demonstration of vaccinia, lymphocytic choriomenin-  
gitis and rabies viruses in the leucocytes of ex-  
perimentally infected animals  
Arch. ges. Virusforsch. 17, 273-279 (1965)

8. BEARD, J. u. P. ROUS  
The fate of vaccinia virus on cultivation in vitro  
with Kupffer cells (reticulo-endothelial cells)  
J. Exper. Med. 67, 883-910 (1938)
9. BENACERRAF, B., G. BIOZZI, B.N. HALPERN u. C. STIFFEL  
Physiology of phagocytosis of particles by the RES.  
Physiopathology of the RES. Symposium 1957, 52-77  
zit. n. MIMS (58)
10. BENDA, R., O. PROCHAZKA, J. CINATL u. V. HRONOVSKY  
Immunfluorescence detection of lymphocytic chorio-  
meningitis virus in guinea pig blood leucocytes  
Acta virol. 14 , 47-52 (1970)
11. BESWICK, T.S.L.  
Experimental herpes simplex infection in the baby  
mouse  
J. Path. Bact. 76, 136-142 (1958)
12. BIOZZI, G., J.G. HOWARD, B.N. HALPERN, C. STIFFEL u.  
D. MOUTEN  
The kinetics of blood clearance of isotopically  
labelled Salmonella enteritidis by the reticulo  
endothelial system in mice  
Immunology 3, 74-89 (1960)
13. BRYANS, J.T.  
On immunity to disease caused by equine herpes-  
virus  
J. Amer. Vet. Med. Ass. 155, 294-300 (1969)
14. BUSCHMANN, H. u. G. SCHÖNERT  
Herstellung und Eigenschaften eines heterologen  
Antimäusemakrophagenserums  
Zbl. Vet. Med. Reihe B. 18, 153-161 (1971)

15. COFFIN, D.L., A. COONS u. V.J. CABASSO  
A histological study of infectious hepatitis by  
means of fluorescent antibody  
J. Exper. Med. 98, 13-20 (1953)
16. COFFIN, D.L. u. C. LIU  
Studies on canine distemper infection by means  
of fluorescein-labelled antibody  
II. The pathology and diagnosis of the naturally  
occurring disease in dogs and the antigenic nature  
of the inclusion body  
Virology 3, 132-145 (1957)
17. COONS, A.H. u. M.H. KAPLAN  
Localisation of antigen in tissue cells. Improve-  
ments in a method for the detection of antigen by  
means of fluorescent antibody  
J. Exper. Med. 91, 1-13 (1950)
18. DIMOCK, W.W. u. P.R. EDWARDS  
Is there a filterable virus abortion of mares?  
Kentucky Agric. Exper. Sta. Bull. 333 (1932)
19. DIMOCK, W.W. u. P.R. EDWARDS  
The differential diagnosis of equine abortion  
with special reference to a hitherto undescribed  
form of epizootic abortion in mares  
Cornell Vet. 26, 231-240 (1936)
20. DIMOCK, W.W., P.R. EDWARDS u. D.W. BRUNNER  
Infection of fetuses and foals  
Kentucky Agric. Exper. Sta. Bull. 509 (1947)
21. DOBSON, E.L. u. H.B. JONES  
The behaviour of intravenously injected parti-  
culate material  
Acta med. Scand. 144, 1-71 (1952)

22. DOLL, E.R., M.G. RICHARDS u. M.E. WALLACE  
Adaptation of the equine abortion virus to  
suckling Syrian hamsters  
Cornell Vet. 43, 551-558 (1953)
23. DOLL, E.R. u. J.H. KINTNER  
A comparative study of the equine abortion and  
influenza viruses  
Cornell Vet. 44, 355-367 (1954)
24. DOLL, E.R., M.E.W. CROWE, J.T. BRYANS u. W.H. McCOLLUM  
Infection immunity in equine virus abortion  
Cornell Vet. 45, 387-410 (1955)
25. DOLL, E.R., J.T. BRYANS, W.H. McCOLLUM u. M.E.W. CROWE  
Propagation of equine abortion virus in Syrian  
hamsters  
Cornell Vet. 46, 68-82 (1956)
26. DOLL, E.R., J.T. BRYANS, W.H. McCOLLUM u. M.E.W. CROWE  
Isolation of a filterable agent causing arteritis  
of horses and abortion by mares. Its differentia-  
tion from the equine abortion virus  
Cornell Vet. 47, 3-41 (1957)
27. EDELMAN, R. u. F.E. WHEELOCK  
Specific role of each human leucocyte type in  
viral infections.  
I. Monocyte as host cell for vesicular stomatitis  
virus replication in vitro  
J. Virol. 1, 1139-1149 (1967)
28. FISHER, T. u. H.S. GINSBERG  
The reaction of influenza virus with guinea-pig  
polymorphonuclear leucocytes.  
II. The reduction of white blood cell-glycolysis  
by influenza viruses and receptor-destroying  
enzyme  
Virology 2, 637-655 (1956)

29. GALTON, M. u. F. HOLT  
Culture of periphall blood leucocytes of the  
golden hamster  
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 144, 218-219 (1963)
30. GARABEDIAN, G. u. J. SYVERTON  
Studies on herpes simplex virus.  
II. An affinity in vitro of herpes simplex virus  
for rabbit microphages and macrophages  
J. Infect. Dis. 96, 5-8 (1955)
31. GÖNCZÖL, E., L. GERGELY, E. JENNEY u. L. VACZI  
Die Vermehrung der Viren der Herpesgruppe in  
humaner überlebender Leukozytenkultur  
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 210, 289-297 (1969)
32. GOODMAN, T.G. u. H. KOPROWSKI  
A cellular basis for virus resistance  
Federation Proc. 20, 265 (1961)
33. GRESSER, I. u. D.J. LANG  
Relationship between viruses and leucocytes  
Progr. Med. Virol. 8, 62-130 (1966)
34. HAMRE, D., J. APPEL u. C.G. LOOSLI  
Viraemia in mice with pulmonary influenza virus  
infections  
J. Lab. Clin. Med. 47, 182-193 (1956)
35. HAVENS, W.P. Jr. u. R.E. MARCK  
The leucocyte response of patients with experi-  
mentally induced infectious hepatitis  
Amer. J. Med. Sci. N.S. 212, 129-138 (1946)
36. HENLE, G., A. GIRARDI u. W. HENLE  
A non-transmissible cytopathogenic effect of  
influenza virus in tissue cultures accompanied  
by formation of non-infectious hemagglutinins  
J. Exper. Med. 101, 25-41 (1955)

37. HOGGAN, M.D., J.F. METZGER u. C.W. SMITH  
Immunofluorescent and histochemical studies of  
equine abortion virus hepatitis in hamsters  
Federation Proc. 20, 426 (1961)
38. HOUSE, E., B. PANSKY u. M.S. JACOBS  
Age changes in the blood of the golden hamster  
Amer. J. Physiol. 200, 1018-1022 (1961)
39. ISHIZAKI, R. u. T. SHIMIZU  
Sequential development of antigens of equine  
rhinopneumonitis virus in infected hamster liver  
cells as studied with fluorescent antibodies  
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 4, 194-204 (1964)
40. JAFFE, R.H. u. S.L. BERMAN  
The relation between Kupffer cells and liver  
cells  
Arch. Pathol. 5, 1020-1027 (1928)
41. JOHNSON, R.T.  
The pathogenesis of herpes virus encephalitis.  
I. Virus pathway to the nervous system of  
suckling mice demonstrated by fluorescent anti-  
body staining  
J. Exper. Med. 119, 343-356 (1964a)
42. JOHNSON, R.T.  
The pathogenesis of herpes virus encephalitis.  
II. A cellular basis for the development of  
resistance with age  
J. Exper. Med. 120, 359-373 (1964b)
43. JONES, S.R.  
Histopathologic changes and specific immuno-  
fluorescence in infant mice infected with  
herpesvirus tamarinus  
Amer. J. Vet. Res. 32, 1143-1153 (1971)

44. KEMENY, L. u. J.E. PEARSON  
Isolation of herpesvirus from equine leucocytes:  
Comparison with equine rhinopneumonitis virus  
Canad. J. Comp. Med. 34, 59-65 (1970)
45. KÖHLER, H. u. J. APODACA  
Über die Erkennung von Adenovirusinfektionen in  
Schweinenieren-Primärkulturen mit Hilfe histolo-  
gischer Verfahren  
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 199, 338 (1966)
46. KOVACS, E., R.K. BARATAWIDJAJA, A. WALMSLEY-HEWSON u.  
N.A. LABZOFFSKY  
Demonstration of poliovirus in isolated leucocytes,  
blood and C.S.F. smears  
Arch. ges. Virusforsch. 14, 143-146 (1963)
47. LIU, C. u. D.L. COFFIN  
Studies on canine distemper infection by means of  
fluorescein-labelled antibody.  
I. The pathogenesis and diagnosis of the disease  
in experimentally infected ferrets  
Virology 3, 115-131 (1957)
48. LORENZ, R.  
Zur Statistik des Plaque-Test  
Arch. ges. Virusforsch. 12, 108-137 (1963)
49. MANNINGER, R. u. J. CSONTOS  
Virusabortus der Stuten  
Dtsch. tierärztl. Wschr. 49, 105-108 (1941)
50. MAYR, A., H.O. BÖHM, J. BRILL u. S. WOYCIECHOWSKA  
Charakterisierung eines Stutenabortvirus aus  
Polen und Vergleich mit bekannten Rhinopneumoni-  
tis-Stämmen des Pferdes  
Arch. ges. Virusforsch. 17, 216-230 (1965)

51. MAYR, A., J. PETTE, K. PETZOLDT u. K. WAGENER

Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen die Rhinopneumonitis (Stutenabort) der Pferde

Zbl. Vet. Med. Reihe B. 15, 406-418 (1968)

52. METCHNIKOFF, E.

Immunity in infectious diseases

Cambridge Univ. Pr., Cambridge (1905)

53. MIMS, C.A.

Rift Valley fever virus in mice.

I. General features of the infection

Brit. J. Exper. Path. 37, 99-109 (1956)

54. MIMS, C.A.

Rift Valley fever virus in mice.

VI. Histological changes in the liver in relation to virus multiplication

Austr. J. Exper. Biol. Med. Sci. 35, 595-604 (1957)

55. MIMS, C.A.

The response of mice to large intravenous injections of ectromelia virus.

I. The fate of injected virus

Brit. J. Exper. Path. 40, 533-542 (1959)

56. MIMS, C.A.

The response of mice to large intravenous injections of ectromelia virus.

II. The growth of virus in the liver

Brit. J. Exper. Path. 40, 543-550 (1959)

57. MIMS, C.A.

An analysis of the toxicity for mice of influenza virus.

II. Intravenous toxicity

Brit. J. Exper. Path. 41, 593-598 (1960)

58. MIMS, C.A.

Aspects of the pathogenesis of virus diseases  
Bact. Rev. 28, 30-71 (1964)

59. MORAILLON, A., B. TOMA, P. GORET, A. BRION,  
Y. RICHARD u. G.J. LUKA ISKANDER

Présence d'herpèsvirus dans les cultures de  
leucocytes de chevaux sains  
Ann. rech. vét. 2, 223-230 (1971)

60. NAHMIAS, A.J., S. KIBRICK u. R.C. ROSAN

Viral leucocyte interrelationship.  
I. Multiplication of a DNA virus -herpes simplex-  
in human leucocyte cultures  
J. Immunol. 93, 69-73 (1964)

61. NISHMI, M. u. H. BERNKOPE

The toxic effect of vaccinia virus on leucocytes  
in vitro  
J. Immunol. 81, 461-466 (1958)

62. PARKS, H.F. u. A.D. CHIQUOINE

Observation on the early stages of phagocytosis  
of colloidal particles by hepatic phagocytes  
of the mouse  
Electron Microscopy. Proc. Stockholm Conf. (1956)  
154-156  
zit. n. MIMS (58)

63. PETZOLDT, K.

Equines Coital-Exanthem  
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 83, 93-95 (1970)

64. PLUMMER, G. u. A.P. WATERSON

Equine herpesviruses  
Virology 19, 412 (1963)

65. RANDALL, C.C. u. E.C. BRACKEN

Studies on hepatitis in hamsters infected with equine abortion virus.

I. Sequential development of inclusions and the growth cycle

Amer. J. Path. 33, 709-719 (1957)

66. ROBERTS, J.A.

Histopathogenesis of mousepox.

I. Respiratory infection

Brit. J. Exper. Path. 43, 451-461 (1962a)

67. ROBERTS, J.A.

Histopathogenesis of mousepox.

III. Ectromelia virulence

Brit. J. Exper. Path. 44, 463-472 (1963c)

68. ROBERTS, J.A.

Growth of virulent and attenuated ectromelia virus in cultured macrophages from normal and ectromelia immune mice

J. Immunol. 92, 837-842 (1964)

69. SAXEGAARD, F.

Isolation and identification of equine rhinopneumonitis virus (equine abortion virus) from cases of abortion and paralysis

Nord. Vet. Med. 18, 504-512 (1966)

70. SCHWÖBEL, W.

Die Plaque-Bildung des Virus der Maul- und Klauenseuche und ihre mathematische Analyse

Arbeiten der Universität Hohenheim. 48.

Ulmer, Stuttgart (1969)

71. SIMONS, M.J.

Congenital rubella: an immunological paradox?

Lancet (1968), II, 1275-1278

72. SOMMERVILLE, R.G.

Rapid diagnosis of viral infections by immun-fluorescent staining of viral antigens in leucocytes and macrophages

Progr. Med. Virol. 10, 398-414 (1968)

73. STUART, A. u. E. DAVIDSON

The handling of antigen-antibody complexes and of antigen by human peritoneal cells in vitro

J. Path. 104, 37-43 (1971)

74. TEGTMEYER, P.J. u. J.E. CRAIGHEAD

Infection of adult mouse macrophages in vitro with cytomegalo virus

Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 129, 690-694 (1968)

75. TEUFEL, P.

unveröffentlicht (1972)

76. TODD, C. u. WHITE

Experiments on cattle plague

Cairo, Gov. Press (1914)

77. VOSS, H., G. HENNEBERG, H. HERRMANN, H. PICHL,  
H. SCHULTE-OVERBERG u. H. WERNER

Die Kopplung von Immunsereen mit Fluoresceiniso-thiocyanat

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 203, 249-276 (1967)

78. WHEELOCK, E.F.

Virus replication and high-titered interferon production in human leucocyte cultures inoculated with Newcastle disease virus

J. Bact. 92, 1415-1421 (1966)

79. WHEELLOCK, E.F. u. R. EDELMAN

Specific role of each human leucocyte type in viral infections

III. 17D yellow fever virus replication and interferon production in homogeneous leucocyte cultures treated with phythemagglutinin

J. Immunol. 103, 429-436 (1969)

80. ZELLER, R. u. P. TEUFEL

Untersuchungen zur respiratorischen Form der Rhinopneumonitis bei erwachsenen Pferden

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 83, 349-352 (1970)

81. ZISMAN, B., M.S. HIRSCH u. A.C. ALLISON

Selective effects of anti-macrophage serum, silica and anti-lymphocyte serum on pathogenesis of herpes virus infection of young adult mice

J. Immunol. 104, 1155-1159 (1970)

Herrn Prof. Dr. Hartwig danke ich herzlich für die Überlassung des Themas meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Teufel, der mich bei der Planung, Durchführung und der Abfassung dieser Arbeit mit fachlichen Anregungen unterstützte.

Allen Mitarbeitern des Institutes danke ich für ihre großzügige Mithilfe.



## LEBENSIAUF

|                |                                                                                                                                 |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 16.10.1943     | geboren als Sohn des Dr.Ing.<br>Heinz Miels und seiner Ehefrau<br>Margarete Miels geb. Reuser<br>in Selb/Bayern                 |
| 1963           | Abitur in Coburg/Bayern                                                                                                         |
| 1965 bis 1971  | Studium der Tiermedizin an der<br>Freien Universität Berlin                                                                     |
| 1968           | Physikum                                                                                                                        |
| 13.5.1971      | 3. Abschnitt der Tierärztlichen<br>Prüfung                                                                                      |
| 24.5.1971      | Bestallung als Tierarzt                                                                                                         |
| seit Juli 1971 | Doktorand, unterstützt durch ein<br>Promotionsstipendium, am Institut<br>für Veterinär-Hygiene der Freien<br>Universität Berlin |





